

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI

**AKUT MYOKARD ENFARKTÜSÜ
SONRASI WNT/BETA KATENİN
SİNYAL İLETİ YOLAĞININ
MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

DR. EMEL FERMANCI

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2006

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI

**AKUT MYOKARD ENFARKTÜSÜ
SONRASI WNT/BETA KATENİN
SİNYAL İLETİ YOLAĞININ
MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

**UZMANLIK TEZİ
DR. EMEL FERMANCI**

**TEZ DANIŞMANLARI:
PROF DR ÜNAL AÇIKEL
YRD DOÇ DR CENK ERDAL**

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 99.3456.23 sayı ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Asistanlığım süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmalarımın planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesinde ilgi ve yardımlarını gördüğüm başta tez danışmanlarım Sayın Prof Dr Ünal Açikel ve Yrd Doç Dr Cenk Erdal olmak üzere, değerli hocalarım Sayın Prof Dr Öztekin Oto, Prof Dr Eyüp Hazan, Prof Dr Baran Uğurlu, Doç Dr Nejat Sarıosmanoğlu, Doç Dr Hüdayi Çatalyürek, Doç Dr Erdem Silistreli, Yrd Doç Dr Özalp Karabay, Yrd Doç Dr Ahmet Önen, Yrd Doç Dr Aydın Şanlı'ya teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, deneysel çalışmamın planlanması ve yürütülmesi aşamasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof Dr Neşe Atabey, Yrd Doç Dr Esra Erdal, Araştırma Görevlileri Dr Aslı Toklu ve İmge Kantur'a, Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof Dr Tülay Canda'ya, Deneysel Hayvanları Laboratuvarı Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof Dr Osman Yılmaz'a ve Göğüs-Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, Uzm Dr Hakan Çomaklı'ya ilgi ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Son olarak da, her zaman yanımda olan, desteklerini esirgemeyen aileme ve hayat arkadaşım Dr Göksel Kılıcı'ya teşekkür ederim.

Dr Emel FERMANCI

İÇİNDEKİLER:

1. ÖZET

2. SUMMARY

3. GİRİŞ ve AMAÇ

4. GENEL BİLGİLER

5. GEREÇ ve YÖNTEM

6. BULGULAR

7. TARTIŞMA

8. KAYNAKLAR

TABLO LİSTESİ:

Tablo 1: Akut iskemide miyokard hücrelerinde değişiklik sekansı.

Tablo 2: Anjiyogenik faktörler ve anjiyogenezi önleyen faktörler.

Tablo 3: Önemli Anjiyogenik Faktörler ve Etki Mekanizmaları

Tablo 4: PCR’da kullanılan primer dizileri, optimize edilmiş yapışma ısıları (Ta), reaksiyonda kullanılan MgCl₂ konsantrasyonları ve siklus sayıları.

Tablo 5: PCR reaksiyon içerięi

Tablo 6: Çalışma ve kontrol grubunun 0.-15.-30. dk ortalama kan gazı değerleri ortalaması.

Tablo 7: Çalışma ve kontrol grubunun 0.-15.-30. dk ortalama TA ve HR değerleri

Tablo 8: Tüm deneklerin TA ve HR 0.-15.-30. dk değerlerinin ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerlerinin analizi

Tablo 9: Kontrol grubunun histopatolojik incelenmesi.

SEKİL LİSTESİ:

Şekil 1: Koroner arterlerin anatomisi; şematik gösterim.

Şekil 2: Normal doku onarımı ve tümörlerde anjiyogenezi uyaran ortak yollar.

Şekil 3a-3b: Wnt/ β -katenin sinyal yolağı.

Şekil 4: Wnt/ kalsiyum sinyal yolağı.

Şekil 5: Cerrahi işlemin şematik görünümü.

Şekil 6: Deneklerin trakeotomi açılıp sağ karotis arterden arteriyel kanül yerleştirilmiş ve sol anterolateral torakotomi yapılarak cerrahi işleme hazırlanmış şekli.

Şekil 7: Denek kalplerinin cerrahi işlem için eksplore edilmiş şekli.

Şekil 8: Çalışma grubunda LAD'nin bağlanıp iskeminin yaratılmış hali.

Şekil 9: Denek kalbinin çıkarılmış hali.

Şekil 10: Doku kesitleri alınan denek kalbi.

Şekil 11: (Kontrol 1) Kalp kası normal özellikte. H&E x400.

Şekil 12: (Kontrol 1) Kalp kası normal özellikte. Masson trikrom x400.

Şekil 13: (Çalışma 1) Konjesyon. H&Ex400.

Şekil 14: (Çalışma 1) Konjesyon. Masson trikromx400.

Şekil 15: (Çalışma 1) Miyofibrillerde kontraksiyon bandı. Masson trikrom x400.

Şekil 16: (Çalışma 2) Konjesyon. H&Ex400.

Şekil 17: (Çalışma 2) Kanama. H&Ex400.

Şekil 18: (Çalışma 3) Kontraksiyon bandı, konjesyon. H&Ex400.

Şekil 19: Deney ve Kontrol gruplarında GAPDH gen ürünleri

Şekil 20: Deney ve Kontrol gruplarında GAPDH gen ürünlerinin densitometrik analizleri

Şekil 21: Deney ve kontrol gruplarında Axin gen ürünleri

Şekil 22: Deney ve kontrol gruplarında iskemik ve kontrol iskemik dokularda Axin geni mRNA değerleri.

Şekil 23: Deney ve kontrol gruplarında sFRZ1 gen ürünleri

Şekil 24: Deney ve kontrol gruplarında sFRZ1 gen ürünlerinin densitometrik analizi

Şekil 25: Deney ve kontrol gruplarında TCF4 gen ürünleri.

Şekil 26: Deney ve kontrol gruplarında TCF4 gen ürünlerinin densitometrik analizi

Şekil 27: Deney ve kontrol gruplarında Fzd2 gen ürünlerinin densitometrik analizi

Şekil 28: Deney ve kontrol gruplarında Fzd2 gen ürünlerinin densitometrik analizi

Şekil 29: Deney ve kontrol gruplarında Wnt9a gen ürünleri

Şekil 30: Deney ve kontrol gruplarında Wnt9a gen ürünlerinin densitometrik analizi

KISALTMALAR:

Wnt : Wingless protein

Frz : Frizzled protein

sFRP1 (FrzA) :Secreted frizzled protein

AMI : Acute Myocardial Infarction

RNA :Ribonükleik Asit

DNA : Deoksiribonükleik Asit

NO : Nitrik oksit

LMCA : Sol ana koroner arter

LAD : Sol ön inen koroner arter

CX : Sirkumfleks koroner arter

RCA : Sağ ana koroner arter

AV nod : Atriyoventriküler nod

ATP : Adenozin trifosfat

TTC : Trifenil-tetrazolium-klorid

EKG : Elektrokardiyografi

LDH : Laktat dehidrogenaz

CPK : Kreatin kinaz

VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktör

PGF : Plasental büyüme faktör

FGF : Asidik, bazik fibroblast büyüme faktör

TGF- α : Transforme edici büyüme faktör α

TGF- β : Transforme edici büyüme faktör β

EGF : Epidermal Growth Factor

HGF : Hepatosit büyüme faktör

TNF- α : Tümör nekroz faktör- α

PDGF : Trombosit kaynaklı büyüme faktör

GCSH : Granülosit koloni uyaran faktör

IL : İnterlökin

RT-PCR : Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

PA : Plazminojen aktivatör

MMP : Matriks metalloproteinaz

uPA : Ürokinaz-tipi PA

tPA : Doku-tipi PA

GSK-3 β : Glikojen Sentaz Kinaz-3 β

FRP : Frizzled ilişkili protein

CK-1 : Casein Kinaz-1

DKK : Dickkopf

DVL=DSH : Dishevelled Protein

WISP : wnt inducible signalling pathway protein

PaCO₂ :Parsiyel arteriyel karbondioksit basıncı

PaO₂ :Parsiyel arteriyel oksijen basıncı

HE : hemotoksilen ve eosin

MT : Masson's Trichrome

GAPDH : Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz

ECM : Ekstrasellüler Matriks

1. ÖZET

AKUT MYOKARD ENFARKTÜSÜ SONRASI WNT/BETA KATENİN SİNYAL İLETİ YOLAĞININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Dr. Emel Fermancı, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi AD,
İzmir, Türkiye.

(emel.fermanci@deu.edu.tr)

AMAÇ: Miyokardiyal enfarktüs ventriküler yapıda ventriküler remodeling oluşumu ile global değişikliklere yol açar. Bu oluşumun arkasında yatan moleküler mekanizma net olarak açıklanamamaktadır. Wnt/ β -katenin sinyal ileti yolağı hücre poliferasyonu, diferansiyasyonu, apoptozis ve hücre oryantasyonunun kontrolünü içeren çeşitli modeling ve remodeling olaylarında rol oynamaktadır. Biz bu yolaktaki değişikliklerin akut miyokardiyal enfarktüs sonrası iskemik ve non-iskemik alanda ani değişikliğin açıklanmasındaki mekanizmalardan biri olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızın amacı iskemik ve non-iskemik miyokard dokularındaki gen ekspresyonu değişimlerini tanımlamak ve geliştirilecek tedavi stratejileri için olası hedef moleküller belirlemektir.

YÖNTEM: Miyokardiyal enfarktüs Wistar ratlarının koroner arter ligasyonu ile oluşturuldu. Ratlar iki gruba ayrıldı. Sham operasyonu ligasyon yapılmayan cerrahi prosedürü içerdi. Operasyon sonrası 30. dakikada tüm hayvanlar sakrifiye edilip, kalpleri çıkarılarak iskemik ve non-iskemik zonlardan miyokardiyal doku örnekleri alındı. Doku örnekleri hemen RNA analizi için flash frozena konuldu. Total RNA çıkarılıp reverse transkripsiyonu yapıldı. cDNA'ların aliquotları semi-kantitatif RT-PCR ile hedef genlere spesifik oligonükleotid primerleri ile amplifiye edildi. Enfarktli zondaki iskemi varlığını belirlemek için doku örnekleri üzerinde histopatolojik analiz yapıldı.

BULGULAR: Wnt1, Wnt3a, Wnt5a, Wnt9a, Axin, β -catenin, salgılanmış Frizzled Related Protein1(sFRP1), Dishellved, Frz2, Frz4 ve Frz6 genlerinden RT-PCR amplifikasyonlarının

optimizasyonu yapılarak; Wnt sinyalizasyonunda rolü olan genlerin ayırıcı ekspresyonu yapıldı. LAD ligasyonu olan ve/veya olmayan hayvanlardan alınan doku örneklerindeki genlerin ekspresyonu kıyaslandığında Frz2 ve sFRP1 transkripsiyon seviyelerinde ligasyona bağlı iskemi etkisiyle farklılık vardı.

SONUÇ: β -katenin proteinlerinin sitoplazmik seviyesini regüle eden sFrz1 ve Frz2 Wnt sinyalizasyonunun salgılanan aktivatörleri veya inhibitörleri olarak bilinmektedirler, bu yüzden ratlarda MI tarafından oluşturulan iskemide myokardiyal hücreleri korumaya yönelik çabuk cevap vermek için bu genlerin ekspresyonunu regüle etmektedirler.

Anahtar Kelimeler: Akut MI, Wnt- β katenin sinyal ileti yolağı, Frz2 ve sFRP1.

2. SUMMARY

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF WNT/B-CATENIN SIGNALING PATHWAY AFTER MYOCARDIAL INFARCTION

Dr. Emel Fermanci, Dokuz Eylül University Faculty of Medicine Department of Cardiovascular Surgery, Izmir, Turkey.

(efermanci@deu.edu.tr)

OBJECTIVES: Myocardial infarction induces global changes in the ventricular architecture, a process called ventricular remodeling. Molecular mechanism behind this process still is not clearly identified. Since Wnt/ β -catenin signaling pathway involves in a variety of modeling and remodeling processes including cell proliferation, differentiation, apoptosis and the control of cell orientation. We assume that alterations in this pathway may be one of the mechanism explaining immediate response in infarct and remote zone after acute myocardial infarction. Aim of our study is to show changing in gene expression at ischemic and non-ischemic myocardial tissues and also finding possible target molecules for treatment strategies.

METHODS: Myocardial infarction was produced by coronary artery ligation of Wistar rats. Animals were divided into two groups. Sham operation comprised surgical procedure without ligature placement. Following thirty minutes after operation, all animals were sacrificed, hearts were dissected and myocardial samples were obtained from remote and infarct zones. Tissue samples were immediately flash-frozen for RNA analysis. Total RNA was extracted and reverse transcribed. Aliquots of cDNA's were then amplified with oligonucleotide primers specific for the target genes by semi-quantitative RT-PCR. Histopathological analysis was established on tissue samples to verify presence of ischemia in infarct zone.

FINDINGS: Optimization of the RT-PCR amplifications from Wnt1, Wnt3a, Wnt5a, Wnt9a, axin, β -catenin, secreted Frizzled Related Protein (sFRP1), Dishelleved, Frz2, Frz4 and Frz6 genes were performed, differential expression of genes which have roles in the Wnt signaling were presented in. When expression of genes have been compared between both groups of

tissues taken from separate animals with and/or without LAD ligation, there were difference for the levels of Frz2 and sFRP1 transcription under the effect of ischemia caused by ligation.

RESULT: SFrz1 and Axin which regulates cytoplasmic level of β -catenin proteins are known as secreted activators or inhibitors of Wnt signaling therefore ischemia occurred by the MI in rats regulate expression of these genes in order to give quick response for protecting myocardial cells.

Key Words: Acute MI, Wnt- β catenin signaling pathway, Frz2 and sFRP1.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda kardiyovasküler patolojilerin oluşumu üzerine yapılan çalışmalar yeni bir bakış açısı getirmiştir. Anjiyogenez ve vasküler yeniden yapılanmanın, gelişim ve büyüme döneminde olduğu bilinmekteydi. Öte yandan gelişim sırasında fetal döneme ait gen sunumunun kardiyovasküler patolojilerde görülebilen bir durum olduğu belirlendikten sonra bu konuda yapılan araştırmalar kardiyovasküler patolojilerin oluşumu sırasındaki gen sunumlarının çeşitliliği hakkında yeni ipuçları sağladı. Özellikle değişim, çoğalma ve yeniden yapılanmada yer alan ve salgılanan proteinlerden oluşan wnt ailesinin kardiyovasküler patolojilerin gelişimi ve ilerlemedeki rolü ile ilgili yakın zamanda oldukça önemli ilerlemeler kaydedildi.^{1,2,3} Bu nedenle bu çalışma wnt-frizzled sinyal ileti yolağının kardiyovasküler hastalıkların gelişimi sırasındaki olası rolü üzerinedir. Akut miyokard enfarktüsü sonrası salgılanan Wnt proteinlerinin non-iskemik alanda anjiyogenez üzerine etkileri daha önce araştırılmamış bir konudur.

Aterosklerotik bir koroner damar tümüyle tıkanığında myokardın yeterli oksijen desteğini alamaması nedeniyle akut miyokard enfarktüsü (MI) olur. Tıkanıklık devam ettiği sürece miyokardiyal hasar alanındaki hücrelerde ölüm ve dokuda nekroz başlar. İskeminin başladığı andan itibaren hücre düzeyinde algılanan hipoksiye yanıt olarak bu stres koşulu altında miyokardiyal hücrelerin korunmalarını ve canlı kalmaya devam edebilmelerini sağlayacak protein yapı değişiklikleri ve gen ekspresyonu değişiklikleri meydana gelmektedir. Hipoksinin algılanmasını takiben, tıkanan damarın beslediği miyokard sahasına kan akımının idamesini gerçekleştirebilecek yeni mekanizmaların aktive olduğu da bilinmektedir.^{4,5}

Sekrete edilen proteinlerden oluşan Wnt ailesi üyeleri hücre polaritesi, çoğalması ve farklılaşması gibi yeniden yapılanma olaylarını düzenlemektedirler. Wnt reseptörü olan frizzled ailesi üyeleri, vasküler hücre farklılaşması ve çoğalması yanında damar yapısının oluşması ve fonksiyonel hale gelmesi süreçlerinde önemli roller oynamaktadır.^{6,7} Wnt/frizzled sistemi hasarlı miyokardın bütünlüğünün korunmasını ve yeniden yapılanma sonrasında fonksiyonel olmasını sağlamaktadır. Wnt ve frizzled genlerinin iskemik ve non-iskemik miyokard dokularında nasıl regüle edildiği, hipoksik stres altındaki miyokardiyal sağkalım ve iskemik miyokarda kan akımının yeniden sağlanması süreçlerinde nasıl bir rol oynadığı tam olarak belirlenememistir.

Non-iskemik olan miyokard dokusunda Wnt/frizzled sistemi aracılığıyla harekete geçirilecek mekanizmalarla iskemik dokuya yönelen vaskülarizasyon sağlanabilir, hasar gören hücrelerin yerine doku bütünlüğünü idame ettirecek myofibroblast göçü uyarılabilir.

Akut miyokard enfaktüsü sonrası ilk iki saat içinde nekroz tam anlamıyla oluşmadan anjiyogenezin başlatılabilmesi hasar alanının daraltılmasını sağlayabilecektir. Bu anlamda salgılanan wnt ailesi proteinlerinin non-iskemik alanda moleküler düzeyde ne gibi değişikliklere neden olduğunu bilmek çok önemlidir.

İskemik miyokard hücrelerinin sağ tutulmasında ve iskemik miyokardiyuma kan akımının idamesinde Wnt/frizzled sistemi etkilerinin belirlenmesi, MI geçirmekte olan hastalara tedavi yaklaşımını daha duyarlı ve seçici hale getirecektir. Çalışmamızın amacı iskemik ve non-iskemik miyokard dokularındaki gen ekspresyonu değişimlerini tanımlamak ve geliştirilecek tedavi stratejileri için olası hedef moleküller belirlemektir.

4. GENEL BİLGİLER

KALP ANATOMİSİ

Kalp, göğüs boşluğunda iki akciğer arasındaki “orta mekan”da (mediastinum’da) perikardiyal bir kese içindedir.⁸ Kalbin 1/3’lük bölümü orta hattın sağında kalır. Kalbin uzun eksenini oblik olup, üstte sağ omuz istikametinden, kalp kaidesinden sola kalp apeksine ve dalak istikametine uzanır. Vertikal kısa eksenini ise atrioventriküler oluk planına uyar.⁹

Koroner Arterlerin Anatomisi

Kalbin cerrahi anatomisi içinde hiçbir bölüm pratik olarak koroner arterlerin anatomisi kadar önemli değildir. Koroner arterlerin normal yerleşimi çok iyi bilinmekle beraber aortik orijindeki önemli varyasyonlar, arteriyel dominantlık ve dallanma paternleri gibi konular halen cerrahi olarak en uzakta kalmış önemli noktalardır.^{10,11}

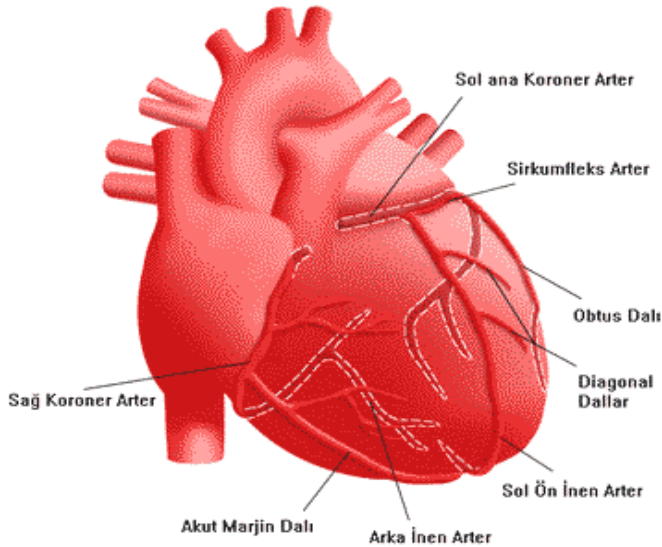
Koroner dolaşım anatomisi arteriyel ve venöz sistemler ve arterler arasındaki anastomozlar olmak üzere üç ana başlıkta incelenebilir. Koroner arterler, aorta ile miyokard içindeki kapiller yataklar arasındaki damar yollarıdır. Sağ ve sol iki büyük koroner damar vardır.⁹ Sağ ve sol koroner arterler karşılıklı aort kapak lifletlerinin arkasından çıkarlar.

a) Sol ana koroner arter (LMCA): Sol ana koroner arter valsalvanın sol sinüsünden anterior ve inferiora ve pulmoner trunkus ile sol atrial apendiks arasında sola doğru seyrederek. Tipik olarak 10-20 mm uzunluğundadır. Ama bazen 40 mm'ye kadar uzayabilir. İnsanların %1'inde sol ana koroner arter olmayabilir. Bu durumda valsalva sinüsünden iki ayrı orifisten çıkar. İki ana dalı vardır; sirkumfleks koroner arter (Cx) ve sol ön inen koroner arter (LAD). Bu dallarını pulmoner trunkusun hemen arkasında verir.

LAD'in sol ventriküle verdiği yan dallara "diagonal damarlar" adı verilir. Diagonal arterler beş veya altı adet olup, sol ventrikülün anterolateral duvarı boyunca uzanırlar ve bu kısımdaki miyokardı beslerler. LAD birçok septal perforatör dal ile interventriküler septumun ön 2/3'ünü ve apikal kısmını besler.

Sirkumfleks koroner arter sol koroner arterden çıkar. Seyri boyunca sol ventriküle çeşitli yan dallar verir. Koroner bypass operasyonlarında sirkumfleks arter dalları birinci marjinal, ikinci marjinal gibi isimler alır. Sol koroner arter dominantlığı olanlarda sirkumfleks dal aşağı doğru bir son dal olarak posterior desendan koroner arteri verir.

b) Sağ koroner arter (RCA): İnsanların %48'inde sağ koroner hakimdir. Bütün sağ ventrikülü, interventriküler septumun arka yarısını ve sol ventrikülün arka duvarının büyük bir kısmını kanlandırır.



Şekil 1: Koroner arterlerin anatomisi; şematik gösterim.

Sol koroner arter kalbin %60'ına yakın bir kısmını beslemektedir. Sinoatriyal düğüm vakalarının %70'inde sağ, %25'inde sol, %5 vakada ise her iki arter tarafından kanlandırılır.⁹

Sağ ve sol koronerlerden hangisinin “dominant” olduğunun saptanmasının önemi diyafragmatik kalp yüzündeki önemli yapıların ve atrioventriküler düğümün hangi koroner tarafından kanlanmasındandır. Böylece sağ koroner arter üzerine yapılan bir ameliyatın sol ventrikül çalışmasını neden düzelttiğini izah etmek mümkün olur. Sağ koroner arterin dominantlığı kalbin crux’ına geldiğinde ve sol ventriküle bir sağ posterior desendan dalını verdiği olur. Bu insanların %70-90 arasında gözlenir. İnsanların %10’unda ise sağ koroner arter kalbin crux’ına yaklaşmaz ve sol koroner arter dominanttır. İnsanların %30’unda hem sağ hem sol koroner arter crux’a yaklaşır, aşağı ve posterior interventriküler alana paralel dallar gönderir. Bu, koroner arterler arasındaki sistem dengesini (balance) açıklar.

Koroner Kollateral Sirkülasyon

Koroner kollateral sirkülasyon koroner arteriyosklerozun gelişmesine karşı major bir defans sağlar.

Major arterler arası ilişki: Direkt kollateraller 3 major koroner arterin her birisi arasında olabilir. Damarların direkt devam etmesi veya iki yönlü kollateral şeklinde olabilir.¹¹

1. Distal sirkumfleks koroner arter ile distal sağ koroner arası,
2. Sağ koroner arterin posterior desendan dalı ile sol anterior desendan arter arası,
3. Sol anterior desendan arter ile distal sirkumfleks koroner arter arası.

Sekonder koroner arterler arası ilişki: Kollateral dolaşım sekonder koroner arterler arasında da ve çift yönlü olabilir.⁹⁻¹¹

1. Konus dalı sol anterior desendan arter arası,
2. Kugel arteri ile AV nod arteri arası,
3. Sol anterior desendan arterin ventriküler septal kollateralleri ile posterior desendan arter arası,
4. Sağ akut marjinal veya sağ anterior ventriküler arter ile sol anterior desendan arter arası,
5. Sirkumfleks marjinal arter ile sağ koroner arter arası,
6. Sirkumfleks marjinal arter ile sol anterior desendan arter arası,
7. Diagonal arter ile sirkumfleks marjinal arter arası,

8. Sağ koroner arterin atriyal dalları ile sirkumfleks arter arası,
9. Atriyal sirkumfleks arter ile sağ koroner arter arası,
10. Diagonal arter ile sol anterior desendan arter arası,
11. Proksimal sirkumfleks marjinal arter ile distal sirkumfleks marjinal arter arası.

AKUT MİYOKARD ENFARKTI

Miyokard enfarktı, geri dönüşümsüz “miyokard nekrozu” anlamı taşır.¹² Koroner arterler üzerindeki fiziksel stresler ve oksijen talebindeki değişiklikler miyokarda kan sunumunu belirler.¹³

AMI gençlik çağından yaşlılığa kadar her çağda görülebilir; insidansı yaşla birlikte progresif olarak artmaktadır. 45 ile 54 yaşları arasında, erkeklerde 4-5 kat daha sıktır, 70-80 yaş arasında bu oran 2:1'e düşer. Yalnızca 80 yaş ve sonrasında cinsiyet farkı ortadan kalkar. Diabetes mellitus gibi bazı predispozan aterojenik durumları olanlar hariç, kadınlar üreme çağı boyunca MI'ya karşı korunmuşlardır. Oral kontraseptifler (özellikle geçmişteki formülleri) 35 yaş üstü ve sigara içen kadınlarda MI riskini arttırırken daha az östrejen içeren yeni formüller bu riski taşımaz.¹⁴

İskemik kalp hastalığının diğer klinik şekilleri gibi MI şiddeti de miyokard O₂ (oksijen) talebi ile koroner kan sunumu arasındaki dengesizliğin derecesi ve süresi ile yakın ilişkilidir. Enfarktüsün uzun süreli sonuçları büyük oranda nekroze olmuş miyokard yaygınlığına bağlıdır. Hastanın semptom ve bulguları uzamış iskemi esnasında gelişen fizyolojik, hücresel ve biyokimyasal değişiklikleri yansıtır.¹³

Patogenez

Miyokard enfarktüsü, genellikle ana koroner arterlerden birinde önceden oluşmuş duvar travması yada kopan bir aterosklerotik plak üzerinde oluşan trombüs sonucu gelişir.¹² Önce iskemi oluşur, iskeminin boyutu önemli olursa ve süresi yeterince uzarsa ardından miyokard enfarktı gelir. Miyokard enfarktının kapsamı; iskeminin boyutuna, tıkanan koroner arterin beslediği kas kitlesine, kollateral kan akımı miktarına ve arterin beslediği dokunun oksijen gereksinimine bağlıdır. Miyokard enfarktı; sol ventrikül duvar kalınlığının tümünü

tuttuğu zaman, transmural; yalnız subendokard ve çevre dokuyu tuttuğu zaman ise, non-transmural'dır.¹²

Şu olaylar dizisi öne sürülmüştür: Spontan olarak veya vazospazma, plak içi hemorajiye, ya da kalp hızında ani artışa bağlı olarak geniş bir aterom rüptüre olur veya çatlar ve plağa eklenen tıkaçıcı trombüsün oluşumunu başlatır.¹⁴ Trombosit tutunuşu ve aktivasyonu, trombüsün yapımına katkıda bulunur ve aktive trombositlerden salınan tromboksan gibi vazoaaktif ürünler vazospazmı daha da arttırabilir.

Bir MI'nün ulaşacağı son durum, dakikalar ile saatler arasında değişen bir zaman diliminde belli olur. Kollateral akım ve kollateraller boyunca olası tekrar akımın oluşturduğu veya fibrinolitik tedavi sonucu lizise uğramış trombüsün sebep olduğu çeşitli iskemi derecelerine bağlı olarak bazı hücre toplulukları diğerlerinden önce ölürlür. Tablo 1'de akut iskemide miyokard hücrelerinde değişiklik sekansı verilmiştir.

Tablo 1: Akut iskemide miyokard hücrelerinde değişiklik sekansı.

ATP azalmasının başlangıcı	Hemen o an
Kontraktilite kaybı	1-2 dk
ATP'nin %50 azalması	10 dk
İrreversibl hücre hasarı	20-40 dk

ATP: Adenozin trifosfat

Hayvanlarda ve muhtemelen insanlarda, transmural enfarktüslerin çoğu subendokardiyal lezyonlar olarak başlar. Subendokardiyal miyokard, sol ventrikül duvarının en az perfüzyonu olan alanıdır. Çünkü sistol sırasında mikrodolaşımı ventrikül duvarının dış katlarının basıncına maruz kalır. Bu nedenle ilk önce bu bölgede harabiyet izlenir. İskemi yeterince ciddi ise, iskemik nekroz duvar boyunca dalga dalga yayılabilir.¹⁴ Enfarktüsün sonuçta ulaşacağı büyüklük (1) iskeminin yaygınlığına, ciddiyetine ve süresine, (2) kollateral akımın çokluğuna, (3) riskli miyokardın metabolik ihtiyaçlarına, (4) reperfüzyon hasarının komplikasyonlarına bağlıdır.¹⁴

Morfoloji:

Tüm transmural enfarktüsler (interventriküler septum dahil olmak üzere) sol ventrikülü tutarlar. Sağ ventrikülün izole tutulumu ise nadirdir, yalnızca sağ ventrikülün kronik olarak gerilmesi ve hipertrofisi ile birlikte görülür.¹⁴ AMİ'lerinin %1-2'si atriumu tutar. Bunlar genellikle geniş bir posterior sol ventrikül enfarktüsüne eşlik eder. Tıkaçıcı bir koroner trombus genellikle, iskemik lezyonu sulayan ana arterde şu şekillerde bulunabilir:¹⁴

Sol ön inen koroner arter	⇒	Apekse yakın sol ventrikülün ön duvarı;
(%40-50)		interventriküler septumun anterior 2/3'ü
Sağ koroner arter	⇒	Sol ventrikülün arka duvarı;
(%30-40)		interventriküler septumun posterior 1/3'ü
Sol sirkumfleks arter	⇒	Sol ventrikülün lateral duvarı
(%15-20)		

AMI'nün morfolojisi zamanla değişir. 8-12 saatten yeni ise, normalden biraz daha soluk olabilir veya çıplak gözle farkedilmeyebilir; bununla beraber ilk 3-6 saat içinde doku kesitleri trifenil-tetrazolium-klorid (TTC) solüsyonuna batırılarak iskemik alanlar belirlenebilir; bu durumda oksidatif enzimlerin korunduğu sağlam miyokard kızıl-kahverengi renk alır. Enfarktüs alanları ise boyanmadığı için soluk kalır. 18 ila 24 saatte enfarktüs, soluk veya siyanotik görünümü nedeni ile ayırt edilebilir. İlerleyen günlerde, enfarktüs daha keskin sınırlarla ayrılır, sarı renk alır ve yumuşar. Birinci haftanın sonunda, hiperemik, iyi kanlanan, nemli konnektif doku ile çevrenir ve bunu izleyen haftalarda enfarktüsün yerinde fibrozis, vasküler skar dokusu gelişir. Birçok durumda, altıncı haftanın sonunda iyi gelişmiş bir skar dokusu vardır. Fakat skar dokusunun bütünüyle enfarktüs alanının yerini alma süresi orijinal lezyonun büyüklüğüne bağlıdır.¹⁴

Temelde, irreversibl olarak zedelenmiş hücreler önce biyokimyasal ve submikroskopik değişiklikler gösterir, daha sonra tipik iskemik koagülatif nekroza uğrar, eosinofili artar, piknoz (nükleus kondansasyonu) gelişir. Daha sonra rezorpsiyon görülür ve skar dokusu bunun yerini alır. Rutin doku boyaları ile koagülatif nekroz ilk 4 ile 8 saatte farkedilmeyebilir, fakat iskeminin başlangıcından sonraki bir saat içinde kontraksiyon yapamayan ölü fibrillere komşu olan canlı kas lifleri anormal gerginliğe maruz kaldıkları için gerilebilir ve dalgalı görünüm alırlar. Hasara uğrayan marjinal hücrelerde veya reperfüzyondan sonra enfarkt

alanındaki hücrelerin tümünde, transvers kontraksiyon bandları ve kimi zaman da intersellüler kanama izlenir.¹⁴

Klinik seyir:

Akut Mİ'nün klinik tanısı üç grup veriye dayanır; (1) semptomlar, (2) EKG (Elektrokardiyografi) değişiklikleri, (3) spesifik serum enzimlerinde yükseliş.¹²⁻¹⁴ Klinik belirtiler bazen tipik değildir. Vakaların %20'si asemptomatiktir ve yalnızca, EKG bulguları ve/veya serum enzimlerindeki yükseliş ile tanı konabilir. Tanıda en değerli laktik dehidrogenaz (LDH) ve kreatin kinazın (CPK) serum seviyeleridir.¹²⁻¹⁴ Bu enzimler ölen miyokard hücrelerinden seruma sızarlar. LDH-1 izoenzimi esas olarak kardiyak bir enzimdir ve 18-36 saatte en yüksek seviyeye ulaşır, 3 veya 4 gün içinde esas değerine düşer. CPK seviyesi ve özellikle MB fraksiyonu daha spesifiktir. 4-8 saatte normalin üstüne çıkar, en üst seviyesine erkenden veya günlerce sonra çıkar ve yaklaşık 4 gün içinde normal seviyeye iner.¹⁴

Akut Miyokard Enfarktında Ritim Bozuklukları

Akut miyokard enfarktı geçiren hastalarda oluşan ritim bozuklukları; hemodinaminin bozulmasına, miyokardın oksijen gereksiniminin artmasına veya süregen ventrikül taşikardisi ya da ventrikül fibrilasyonu gibi malign ritim bozukluklarına yol açarsa, tedavi edilmelidir.¹² Normal koşullarda pek zararlı olmayan bazı ritim bozuklukları katı ve kompliyansını yitirmiş ventrikülleri olan hastalarda atriyoventriküler zamanlamanın bozulması sonucu kalp debisini düşürebilir.¹²

Akut miyokard enfarktını izleyen erken dönemde, ventrikül odaklı erken atımlar sık görülür. Ventrikül odaklı erken atımlar, her ne kadar sonradan gelişecek ventrikül taşikardisi veya fibrilasyonu erken uyarıcısı kabul edilirse de, ventrikül fibrilasyonunun uyarıcı bir ritim bozukluğu olmaksızın doğrudan başladığı hasta sayısı da fazladır. Hemodinamiyi bozan süregen ventrikül taşikardisi oluşursa, hemen kardiyoversiyon uygulanmalıdır. İyi tolere ediliyorsa, kısa bir süre için sınırlı lidocaine tedavisi denenebilir. AMI nedeniyle hastaneye yatırılan hastaların %2-3'ünde ventrikül fibrilasyonu görülür ve bu hastalar vakit yitirilmeden 200-400 joule ile defibrile edilmelidir.¹²

Atriyal flutter veya fibrilasyonun neden olduğu ventrikül hız artışları, miyokardın oksijen kullanımını yükselttikleri için, süratle tedavi edilmelidir. Ventrikül hızı farmakolojik ajanlarla kontrol altına alnamıyorsa, erken elektrikli kardiyoversiyon düşünülmelidir.^{12,13}

ANJİYOGENEZ

Mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi demek olan anjiyogenez, vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olup, bazı durumlarda patolojik de olabilir.¹⁵ Fizyolojik anjiyogenez; embriyogenez, yara iyileşmesi ve kadın üreme sisteminde gözlenir.¹⁶ Proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda anjiyogenez kontrol edilemez. İnflamatuar hastalıklarda, çeşitli kanserlerde ve göz hastalıklarında anjiyogenez patolojik olarak ortaya çıkmaktadır.^{17,18}

Anjiyogenez oldukça karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir. Ekstraselüler matriks ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri anjiyogenezde temel rol oynar.¹⁹⁻²² Damar endotelini oluşturan endotel hücreleri, anjiyogenez süreci içinde yer alan temel hücrelerdir. Perisitler ile birlikte kapiller damar duvarlarını oluştururlar ve ana damarları, dalları ve kapiller ağı oluşturucu genetik bilgileri içerirler.²³ Erişkin insanlardaki vasküler endotelyal hücreler tipik olarak düşük turnover hızında olmalarına rağmen, yaşamları boyunca yeni kan damarları oluşturacak çoğalma kapasitesine sahiptirler.²⁴

Anjiyogenezin düzenlenme evreleri pek çok büyüme faktörünün ve düzenleyici proteinin kontrolü altındadır. Anjiyogenik uyaranların artışı ve anjiyogenez inhibitörlerinin azalışı anjiyogenezi başlatmaktadır. Anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler Tablo 2’de gösterilmektedir.²⁵ Tablo 3’de ise önemli anjiyogenik faktörler ve etki mekanizmaları özetlenmiştir.

Tablo 2: Anjiyogenik faktörler ve anjiyogenezi önleyen faktörler.

Anjiyogenik Faktörler	Anjiyogenezi Önleyen Faktörler
VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktör)	Trombospondin- 1
PGF (Plasental büyüme faktör)	Anjiyostatin
FGF (Asidik, bazik fibroblast büyüme faktör)	Endostatin
FGF-3 (Fibroblast büyüme faktör-3)	Vazostatin
FGF-4 (Fibroblast büyüme faktör-4)	Vasküler endotelial büyüme faktörü inhibitörü
TGF- α (Transforme edici büyüme faktör α)	Trombosit faktör-4 fragmanı
TGF- β (Transforme edici büyüme faktör- β)	Prolaktin derivesi
EGF (Epidermal büyüme faktör)	Restin
HGF (Hepatosit büyüme faktör)	Proliferinle ilgili protein
TNF- α (Tümör nekroz faktör- α)	İnterferon- α - β
PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktör)	Anjiyopoetin-2
GCSF (Granülosit koloni uyaran faktör)	Antitrombin-3 fragmanı
IL- 8 (İnterlökin-8)	İnterferon ile indüklenebilen protein- 10
Anjiyogenin	
Proliferin	
NO (Nitrik oksit)	

Tablo 3: Önemli Anjiyogenik Faktörler ve Etki Mekanizmaları

FAKTÖR	ETKİ MEKANİZMASI
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	Endotelyal mitojen, Survival faktör, Permeabilite indükleyici
Basic Fibroblast Growth Faktör (bFGF / FGF-2)	Endotelyal mitojen, Anjiyogenez indükleyici Survival faktör Flk-1 Ekspresyon indükleyici
FGF-1, FGF-3, FGF-4	Endotelyal mitojen Anjiyogenez indükleyici
Transforming Growth Factor α (TGF- α)	Endotelyal mitojen Anjiyogenez indükleyici VEGF ekspresyonu indükleyici
Epidermal Growth Factor	Zayıf endotelyal mitojen VEGF ekspresyonu indükleyici
Hepocyte Growth Factor / Scatter Factor (HGF/SF)	Endotelyal mitojen, mitojen Anjiyogenez indükleyici
Transforming Growth Factor β (TGF- β)	Endotelyal büyüme inhibisyonu Anjiyogenez indükleyici VEGF ekspresyonu indükleyici
Tumor Necrosis Factor α (TNF- α)	Endotelyal mitojen Anjiyogenez indükleyici VEGF ekspresyonu indükleyici
Platelet Derived Growth Factor (PDGF)	Endotelyal mitojen Endotelyal motilite faktörü Anjiyogenez indükleyici

Yeni damar oluşumu aşağıda belirtilen olayları kapsayan çok basamaklı bir süreçtir:

1. Bazal membranın proteolitik enzimler tarafından yıkılması,
2. Endotel hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve göçü,
3. Tübül oluşumu ve olgunlaşma, damar stabilizasyonu ve ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi.

1. Bazal Membranın Proteolitik Enzimler Tarafından Yıkılması

Anjiyogenez süreci damar endotelini döşeyen kollajen, laminin gibi glikoproteinlerden ve heparan sülfat gibi proteoglikanlardan oluşan bazal membranın proteolitik yıkımı ile başlar.²⁶ Endotel hücreleri göç etmek ve çoğalmak üzere uyarıldığında membran ve hücreler arasında bir bölünme meydana gelir. Normalde, endotel hücreleri yayılma etkisi göstermeyen tek bir tabaka oluştururlar. Ancak anjiyogenez sırasında çoğalıp yayılma gösterirler. Normal, hastalıklı yada hasarlı dokularda üretilip salgılanan anjiyogenik büyüme faktörleri komşu dokulara difüzyon yolu ile geçer. Anjiyogenik büyüme faktörleri yakınındaki önceden var olan kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan özgün reseptörlere bağlanırlar. Büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenlerinin yıkımına neden olur. ECM'nin enzimatik yıkımını, endotel hücrelerinin uyarılması ve kapiller filizlenme izler.²⁷ Endotel hücrelerinin invazyon ve göç süreçleri, plazminojen aktivatör (PA) ve matriks metalloproteinaz (MMP) sisteminin işbirliği içinde aktive olmasını gerektirir. Ürokinaz-tip (uPA) ve doku-tip (tPA) plazminojen aktivatörleri plazminojeni plazmine çeviren serin proteazları grubuna aittirler. ECM bileşenlerinin yıkılması ve MMP-1, MMP-3, MMP-9, elastaz gibi matriks metalloproteinazlarının aktivasyonu da plazminin işlevleri arasındadır.²⁸⁻³⁰

2. Endotel Hücrelerinde Göçme ve Çoğalma

Anjiyogenik uyarı, proteolitik yıkım ile kısa bir süre sonra endotel hücrelerini aktive eder. Endotel hücreleri ekstrasellüler matrikse göç eder ve çoğalır. Bu süreçte en etkili anjiyogenik faktör vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'dir.³¹

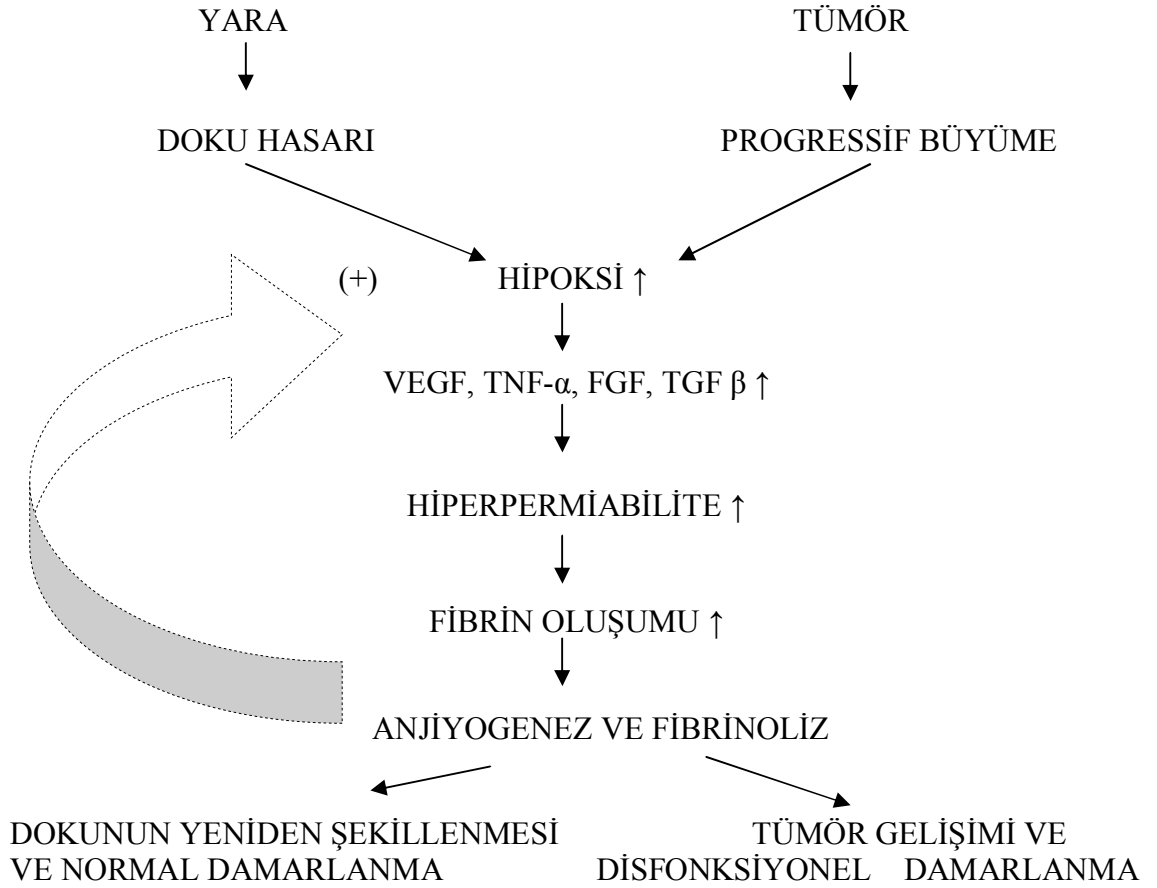
3. Kapiller Oluşumu ve Damar Olgunlaşması

Endotel hücre çoğalmasından sonra ECM bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstrasellüler proteoliz mutlaka lokal olarak inhibe edilmelidir. Kapiller filizlenme oluşuktan sonra yine bu filizlenmenin ucunda yeni oluşmuş ECM'de yıkılma ortaya çıkar ve bu sayede daha ileri yayılımı mümkün olur. Bazal membranın yıkılması

endotel hücre göçüne ve filiz oluşumuna izin verir. Endotelin yol alması ve uzaması sırasında hücre içi ve hücreler arası boşlukta, sonunda kendilerinden damarların oluştuğu lümenler gelişir. Böylece, ekstrasellüler matriks proteolizisinin birbirini sırayla izleyen aktivasyon ve inhibisyonları sonucunda kapillerler oluşur. Proteolitik yıkılma ve endotel hücresi göçünden sonra yeni oluşan kapillerler, yeni bazal membranı oluştururlar. Bu nedenle, endotel hücrelerinin yeni kapiller yapılar oluşturabilmeleri için birbirlerine ve ECM'e tutunma gereksinimi vardır. Damar olgunlaştıktan ve uygun anjiyogenez ortaya çıktıktan sonra anjiyogenik faktörlerde azalma görülürken, anjiyogenez inhibitörlerinde artış gözlenir. Böylece endotel hücreleri sessiz bir hale bürünür ve damarlar kan akımını başlatmaya hazır hale gelmiş olur.^{25,32}

Bu olayları özetleyecek olursak; fibroblast büyüme faktörü (basic-FGF) ve VEGF gibi büyüme faktörlerinin aktivasyonu, hücrelerin çoğalmasını ve ekstrasellüler matriks içine göç etmesini uyarır. Aynı zamanda büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ECM bileşenlerinin yıkılmasına neden olur. Mitojenik endotel hücreleri kapiller filizleri oluşturur. İntegrinler gibi membran proteinleri de bu süreç içinde yer alır ve endotel hücrelerinin birbirine ve ECM'ye tutunmalarına yardımcı olurlar, böylece yeni kapillerler oluşur. Büyüme faktörlerinin inhibisyonu veya büyüme faktör inhibitörlerinin varlığı anjiyogenezi azaltır. ECM'nin proteolitik yıkımı da inhibe olur ve yeni oluşmuş kapillerler etrafında matriks bileşenleri sentez edilir (Şekil 2).

Şekil 2: Normal doku onarımı ve tümörlerde anjiyogenezi uyaran ortak yollar



Bazı Anjiogenik Faktörlerin Özellikleri

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü: (Vascular endothelial growth factor; VEGF);

VEGF anjiyogeneizde rol oynayan faktörlerden biridir. VEGF; postnatal damarlanma, yara iyileşmesi, kanser, romatoid artrit, retina da yeni damarlanma ve kalp-damar hastalıkları dahil olmak üzere çok sayıdaki patofizyolojik durumda önemlidir. VEGF başlangıçta damar geçirgenliğini arttıran bir faktör olarak tanımlanmıştır. Endotel hücrelerinin çok sayıdaki biyolojik fonksiyonunu, sitokin sentezi ve salınımını, trombolitik ve pıhtılaşma yollarında yer alan moleküllerin ekspresyonunu ve düz kas hücre hiperplazisini düzenler.³³⁻³⁷

Epidermal Büyüme Faktörü: (Epidermal growth factor, EGF);

Polipeptit yapılu olup birçok dokuda bulunur ve trombosit degranülasyonu sırasında salınır. Epitel hücreler, endotel ve fibroblastlar için kemotaktiktir. Anjiyogenezi ve kollagenaz aktivitesini uyarır.³⁸

Fibroblast Büyüme Faktörü: (Fibroblast growth factor, FGF);

Mezenkimal hücreler için mitojendir. Endotel proliferasyonu ve motiliteyi artırarak neovaskülarizasyonu hızlandırarak anjiyogenezde etkilidir. Ayrıca heparinin etkilerini güçlendirmek, kollajen sentezini uyararak, yaranın kontraksiyonunu ve epitelizasyonu sağlamak ve fibronektin ve proteoglikan sentezini uyararak adhezyonu kolaylaştırmak gibi etkileri vardır.³⁹

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü: (Platelet-derived growth factor, PDGF);

Trombositlerin alfa granülleri içinde bulunur. Tümörler, endotel hücreler, makrofajlar, düz kas hücreleri ve trombositler PDGF benzeri büyüme faktörleri salgırlar. Makrofajlar ve polimorf nüveli lökositlerin kemotaksisini uyarır. Fibroblast ve düz kas hücrelerinde hem kemotaksis hem mitogenezi uyarır. Kollajen ve fibronektin sentezini uyarır; ayrıca kollajenaz aktivitesini artırır.⁴⁰

Transforme Edici Büyüme Faktörü- β : (Transforming growth factor β , TGF- β);

Trombositler, makrofajlar, lenfositler, kemik, böbrek gibi farklı dokulardan izole edilmiştir. Trombositlerin alfa granülleri içinde yoğun miktarda bulunur, hasarlanan bölgeye degranülasyonla salınır. Düşük dozda anjiyogenik, yüksek dozda antianjiyogenik özellikler gösterir. Monositleri uyararak FGF, PDGF, TNF- α , IL-1 gibi büyüme faktörlerinin salınımını sağlar. Makrofajlar için kemotaktiktir; fibroblast kemotaksisi ve proliferasyonunu uyarır. Kollajen sentezini uyarırken, diğer taraftan kollajenazı aktive eden faktörlerin etkisini azaltır. Fibroblastlarda fibronektin ve proteoglikan sentezini uyararak yara kontraksiyonunda rol oynar. Matriks remodeling olayında görev yapar. Ayrıca epitelyal hücre proliferasyonunu uyarır.⁴¹

Tümör Nekrozis Faktör -Alfa (Tumor necrosis factor; TNF- α);

Kanser kaşeksisi ve endotoksik şokta yer alır. Ateş yükseltici özelliği bulunur. Düşük dozda endotelyal hücre çoğalmasını ve tübül oluşumunu sağlarken, yüksek dozda zıt etki gösterir. Proenflamatuar özellikleri ile in vivo olarak yeni damar oluşumuna yol açar.⁴²

WNT SİNYAL İLETİM YOLAKLARI VE KARDİYOVASKÜLER HASTALIKLAR

Salgılanabilen ve sistein'ce zengin glikoproteinlerden oluşan wnt protein ailesi üyeleri, reseptör aracılıklı sinyal yollarının aktivasyonunda kullanılan ligandlar olarak görev yaparlar. Wnt'lerin başlattığı sinyal yollarının, omurgalı ve omurgasızların embriyolojik gelişimi sırasında hücre proliferasyonu ve göçü, hücre kaderinin belirlenmesi ve hücrenin farklılaşması gibi çeşitli olaylarda önemli role sahip oldukları bilinmektedir.^{43,44} Bu yolların özellikle memelilerde merkezi sinir sistemi, iskelet sistemi ve ekstremitelerin gelişimindeki önemi de gösterilmiştir.^{45,46} Bunlara ek olarak son yıllarda omurgalı embriyolarında erken fetal dönemde anterior mezodermden “kardiyak crescent” olarak bilinen bir grup hücrenin hemen yanlarındaki endodermden salgılanan wnt ve benzeri bir takım proteinlerin uyarımı ile farklılaşarak kalp oluşumunu başlattıkları ve kardiyovasküler morfogenez ve yapılanmada da rol aldıkları bildirilmiştir.^{44, 45,47}

Yine kardiyovasküler patolojilerin ortaya çıkış nedenleri ile ilgili yapılan moleküler çalışmalarda fetal döneme ait bu gen ekspresyonlarının sıklıkla görülmesi bilim çevrelerinde heyecan yaratmış ve bu konuda yeni bir alanın varlığını ortaya koymuştur.^{3,48-51}

Kanatsız sirke sineğinde yapılan embriyolojik gelişimle ilgili araştırmalar sırasında bu süreçte rol oynadığı belirlenen ve ismini buradan alan (wingless) wnt proteinleri üzerine ilk araştırmalar çeşitli neoplastik hastalıklarla ilgili sitobiyolojik incelemeler sırasında yapılmıştır.

Yakın bir geçmişte kardiyovasküler patolojilerde fetal döneme ait gen ekspresyonlarının sıklıkla görülen bir durum olduğunun belirlenmesi bu konuda wnt-frizzled yolağının önemini arttırmış ve birçok çalışmanın başlatılmasına neden olmuştur. Bu çalışmalarda β -katenin'in kardiyak ve endotel hücrelerinde çeşitli nedenlerle gelişen (MI, travma gibi) yaralanmalar sonrası gen transkripsiyonu ve hücre çoğalma sürecinde yer aldığı gösterilmiştir.

Wnt-frizzled yolağının yeniden damarlanma ve anjiyogenez sürecinde oynadığı rol konusunda yapılan çalışmalar özellikle anjiyogenez sırasında önemli bir belirleyici olan VEGF'nin, endotel hücrelerinde başlattığı β -katenine ait tirozinin fosforilasyonu üzerinde durmaktadır. VEGF bu süreç sonunda adheran bağlarda β -katenin/kadherin dağılımında değişikliklere neden olmaktadır. GSK-3 β 'nin etkisizleştirilmesi kardiyomiyositlerde hipertrofiye neden olurken, etkinleştirilmesi ise deney hayvanlarında endothelin-1 ve

phenylephrin'e verilmesine yanıt olarak gelişen hipertrofiyi engellemektedir. Arter yaralanması sonrası iki ile yedi gün içinde Rfzb-1 ekspresyonu artmaktadır.

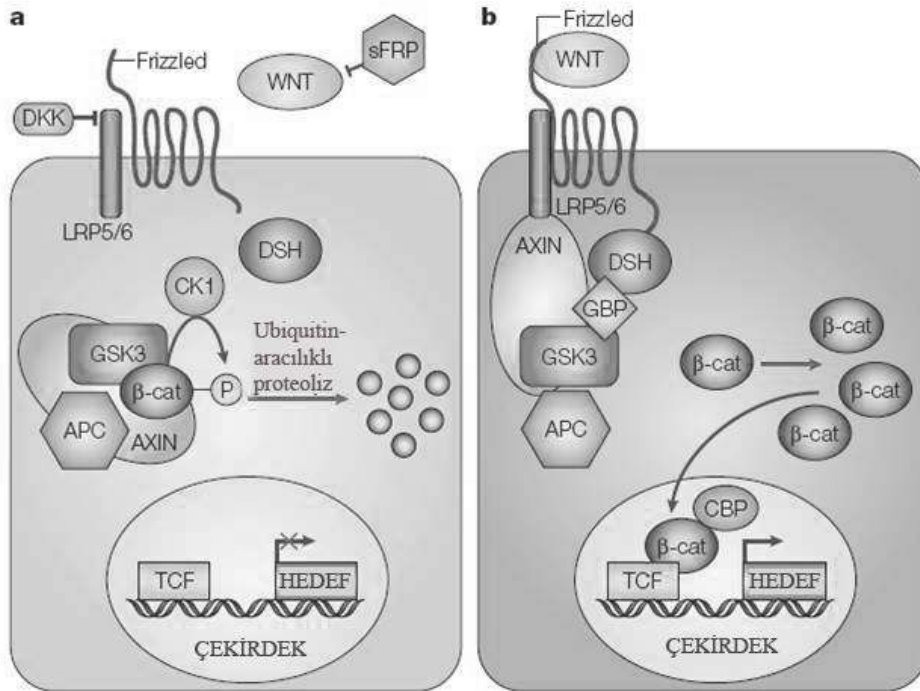
Sonuç olarak daha açıklanması gereken birçok konu bulunsa da son yıllarda yapılan bir çok çalışma wnt-frizzled yolağının kardiyovasküler patolojilerin gelişimi sırasındaki önemini ortaya koymuştur.

Wnt Sinyal İletim Yolakları

Wnt proteinleri fonksiyonları bakımından düşünüldüğünde iki sınıfa ayrılabilir. Bunlar wnt1 ve wnt5a'dır.³ Wnt 1 sınıfı proteinler Xenopus'ın erken embriyolojik gelişimi sırasında vücut aksının kopyalanmasını sağlarken wnt5a sınıfı proteinler ise morfojenik hareketleri etkiler ve wnt1 sınıfı proteinleri antagonize eder. Bu iki sınıf wnt proteinlerinin farklı etkileri olasılıkla onlarla ilintili iki sinyal ileti yolağı olmasından dolayıdır. Kanonikal yolak olarak bilinen wnt1 sınıfı proteinlerin görev aldığı yolak genellikle β -katenin üzerinden sinyal iletirken, wnt5a sınıfı proteinlerin içinde buldukları kanonikal olmayan yolak ya da başka bir deyişle Wnt / Ca^{2+} yolağı hücre içi kalsiyum salınımını artırarak sinyal iletir.

β -katenin Bağımlı Wnt Sinyal Yolağı:

Hücrede β -katenin plazma membranındaki cadherinler'le ya da başlıca Axin, APC, Casein Kinaz (CK1) ve Glikojen Sentaz Kinaz (GSK3b) içeren ve "destruction complex" (yıkıcı kompleks) adı verilen bir yapı ile bağlı olarak bulunur.

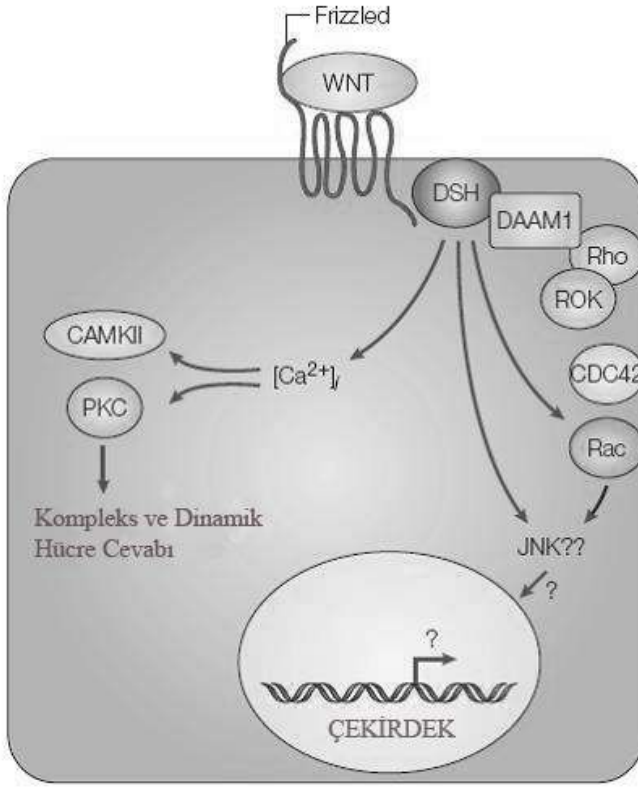


Şekil 3a-3b: Wnt/ β katenin sinyal yolağı

Şekil 3a'da görüldüğü gibi, Wnt ligandı olmadığında yıkıcı kompleks içerisinde bulunan β -katenin GSK3b tarafından fosforile edilerek serbest hale geçer ve ubiquitin sisteminde tanınarak yıkıma uğrar.⁵² Hücrenin “off-state” dediği ya da başka bir deyişle yolağın kapalı olduğu bu durumda β -katenin sitoplazma ve çekirdekte yok denecek kadar azdır ve bu yolağın sorumlu olduğu proliferasyon ve farklılaşma ile ilgili hedef genler yardımcı represör proteini Groucho ile bağlı olan TCF ve LEF transkripsiyon faktörleri tarafından baskılanmaktadır. Yine bu durumda yolağın aktivasyonunu önlemek üzere, salgılanabilen Frizzled Proteini (sFRP) ve Dickkopf (DKK) sırasıyla hücre dışındaki Wnt ligandlarına ve yardımcı reseptör görevi yapan LRP5/6'ya bağlanırlar. Wnt'in Frizzled (Frz) reseptörüne bağlanması, sitoplazmada Dishevelled (DSH ya da DVL) adı verilen bir fosfoprotein aktivasyonuna ve axin ile bağlı olduğu yıkıcı kompleksin plazma membranına iterek axin'in yıkımına neden olur (Şekil 3b).⁵² Yine DSH'nin aktivasyonu GSK3b'nin inhibisyonunu, dolayısı ile β -katenin'nin fosforillenmemesini ve sitoplazmada birikmesini sağlar. Sitoplazmada biriken β -katenin çekirdeğe giderek Groucho ile bağlanır. Bu da TCF/LEF'in serbest kalmasını ve hedef genlerin transkripsiyonunu başlatmasını sağlar. Sonuç olarak, hücrenin “on-state” ya da yolağın açık olduğu bu durumda wnt bağımlı axin yıkımı ve GSK3b inhibisyonu ile çekirdekte β -katenin birikerek bu yolağın sorumlu olduğu genlerin transkripsiyonunu başlatmış olur.

Wnt/ Kalsiyum Sinyali:

Sirke sineği *D. Melanogaster*'in Planar-Cell-Polarity yolağı ile çok benzerlik gösteren Wnt/Ca yolağı, mekanizmasını çok iyi bilinmemekle birlikte, özellikle omurgalı erken fetal dönemde hücre göçü ile ilgili genlerin ekspresyonundan sorumludur. Şekil 4.'deki olası modelde de görüldüğü gibi Wnt'in Frz'a bağlanması ile aktiveleşen DSH, kalsiyum salınımına ve buna bağlı kalsiyum-duyarlı PKC enzimi ile Kalsiyum/Kalmodulin-bağımlı protein kinaz II'nin ekspresyonunu sağlar.⁵² Yine bu yolla, β -katenin yolağından farklı başka sitoplazmik proteinlerin de aktivasyonunu sağlar. Özellikle Wnt5'in ve Frz2'nin bu yolaktaki rolü bilinmektedir.



Şekil 4: Wnt/ kalsiyum sinyal yolağı

Son yıllarda yapılan çalışmalarda her iki Wnt yolağında kardiogenez ve kalp hastalıklarında önemli role sahip oldukları gösterilmiştir.⁴⁹⁻⁵⁶

Wnt Sinyal İletim Yolakları

1) Kardiyak Yaralanma ve İyileşme Süreci

Kardiyovasküler hastalıklarda özellikle miyokard enfarktüsü (MI) sonrası yara iyileşmesinde hücre çoğalması ve göçü önemli bir rol oynamaktadır. Bu yara iyileşme süreci enfarkt alanında fibroblast benzeri hücrelerin çoğalmasını ve göçünü içeren karışık bir takım olayları kapsamaktadır.⁵³⁻⁵⁵ Bu fibroblast benzeri hücreler enfarkt alanında oluşan granülasyon dokusunda bulunan hücre dışı matriksin depolanmasından sorumludur. Fakat normal fibroblastların aksine bu hücreler kontraktil yapıdadır ve böylece ileride miyofibroblastlara dönüşebilecek özelliklere sahiptirler. Granülasyon ve yara dokusu olgunlaştığında epikard ve endokard boyunca organize diziler halinde miyofibroblastlar bulunabilmektedir.

Miyofibroblastların kontraktıl yapısı ve ciddi biçimde organize dizilim halinde bulunmaları enfarktüs alanının dilate olmasını engelleyerek kardiyak fonksiyonların korunmasına katkıda bulduklarını düşündürmektedir.^{56,57} Bazı çalışmalarda farelerde MI sonrası fibroblastların çoğalması ve göçü sırasında frizzled 2, enfarkt alanında bulunanların ise *dv11* eksprese ettikleri gösterilmiştir. Frizzled 2 ekspresyonunun yalnızca miyofibroblastların göçü sırasında olması uzama işlemi ile ilgisini düşündürmektedir.² Benzer olarak bir başka çalışmada, *Dv11* geni yokedilmiş farelerde MI sonrası ilk hafta içinde enfarkt alanında rüptür oranı %75 iken kontrol grubunda bu oran %10 olarak bulunmuştur.⁵⁸ Yine bu konuyla ilgili olarak MI sonrası rüptür görülen farelerin enfarkt alanından alınan canlı miyokard hücrelerinin intercalated diskleri immunohistokimya yöntemi ile boyanmış ve β -katenin birikimi kontrol grubuna oranla çok düşük düzeyde bulunmuştur.⁵⁹ Bu durum kardiyomyositler arasındaki sıkı bağlarda β -katenin eksikliğinin kalbin yapısal bütünlüğünün bozulmasına neden olduğunu göstermektedir. Yine, MI geçirilmiş farelerde tüm genom değişikliklerine bakmak için yapılan bir array çalışmasında da enfarkt alanında *wnt* inducible signalling pathway protein’de (WISP) artış varken β -katenin seviyesinde ciddi derecede azalma belirlenmiştir.⁵¹

Bunlara ek olarak, fare modelinde bir *wnt* inhibitörü olan *sFRP1*(FrzA)’in artmış ekspresyonu enfarkt alanının azalmasını ve kardiyak fonksiyonların gelişimini sağladığı bildirilmiştir.⁶⁰

II) Kardiyak Hipertrofi ve Kalp Yetmezliği

İnsanlarda kalbin ard yükü herhangi bir nedenle arttığında kardiyomyositlerde buna cevap olarak hipertrofi gelişmektedir. Deneysel çalışmalarda da tavşan veya sıçanlarda aortanın kısmi olarak kapatılması sonucu oluşan benzer bir durum sözkonusudur. Hipertrofi gelişimi sırasında *c-fos*, *c-myc* ve *c-jun* gibi bu süreci düzenlediği düşünülen proto-onkogenlerin sunumuda artmaktadır. Sıçanlarda hipertrofi gelişimi sırasında frizzled 2 sunumunun arttığı gösterilmiştir.⁶¹ Frizzled 2’nin hücre içinde bulunan β -katenin miktarını hipertrofi gelişimi sırasında nasıl arttırdığı netleşmemişse de *Wnt*-frizzled yolağının kardiyak hipertrofi gelişimi sırasında aktive olduğu gösterilmiştir.⁶² Kardiyak hipertrofi sırasında fetal gen ekspresyon biçiminin tekrarladığı gösterilmiştir Bu nedenle kardiyak gelişim sırasındaki gen ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalar hipertrofi oluşum mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Yakın zamanda *xenopus* ve *civciv*lerde yapılan çalışmalar anterolateral mezoderimde oluşan kardiyogenezin nöral tüpten gelen sinyallerle inhibe

edildiğini ve bu tipte sinyallerin wnt-1 ve wnt-3a tarafından taklit edilebildiğini göstermiştir. Dickkopf-1 ve crescent gibi wnt yolağının antagonistleri bu alanda kalp oluşumunun induksiyonu için gereklidirler. Normal kalp gelişimi sırasında konikal wnt yolağı üzerinden GSK-3 β 'ninde rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca civcivlerde yapılan bazı çalışmalar wnt sinyal yolağının baskılanmasının anterolateral mezoderimde kalp oluşumunu teşvik ettiğini aktif haldeki wnt sinyal yolağının ise posterolateral mezoderimde kan oluşumunu arttırdığını göstermiştir.⁶³

Kardiyomiyosit hücre kültüründe yapılan çalışmada GSK-3 β 'nin fonksiyonlarının baskılanmasının hipertrofi gelişimindeki önemli rolü gösterilmiştir.⁶² Aynı çalışmada GSK-3 β 'nin sunumunda artmanın endothelin-1 ve phenylephrinle oluşturulan hipertrofik yanıtı engellediği de belirlenmiştir. İnsan çalışmalarında ise özellikle kalp yetmezliği olan hastalarda GSK-3 β inhibisyonu belirgindir.

Schumann ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kalp yetmezliği olan olgularda Frizzled ilişkili proteinlerin (FRP) ekspresyonunu göstermişlerdir.⁶⁴ FRP'ler CDR içeren fakat transmembran bağları bulunmayan, Frizzled proteinlerine benzeyen salgılanabilir bir grup proteinden oluşmaktadır. Bu grup interstisyumda dolaşan proteinlerin ekspresyonunun artması bunlara bağlanan wnt proteinlerinin hücre membranını geçememesine ve dolaylı olarak inhibisyonuna neden olmaktadır. Sonuç olarak kalp yetmezliği olan olgularda wnt proteinlerinin dolaylı olarak inhibisyonu gözlenmektedir.

III) Anjiyogenez, Neovaskülarizasyon ve Arter Yaralanması

İskemik kalp hastalıklarında özellikle miyokard enfarktüsü sonrasında enfarkt alanında kan dolaşımının yeniden sağlanabilmesi için anjiyogenez önemli bir süreçtir. Primer endotel hücre kültürlerinde wnt-1'in aşırı ekspresyonu serbest β -katenin ve TCF/LEF kontrollü gen transkripsiyonunu arttırmış ve hücrelerin çoğalmasına neden olmuştur.⁶⁵ Farelerde fzd5 geninin yokluğu anjiyogenez kusuruna, bu da 11. gün civarında embriyonun kaybına neden olmaktadır. Nüklear β -katenin hücre döngü kontrolü üzerine etki ederek çoğalmayı sağlarken plasma membranında bulunan β -katenin yapışma üzerine etki etmektedir. Bu veriler wnt-frizzled yolağının damar oluşumu ve gelişimindeki olası rollerini açıkça ortaya koymaktadır. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) anjiyogenezin asıl düzenleyicisidir ve MI sonrası yeni damar gelişiminde oynadığı önemli rol bilinmektedir. İnvitro deneyler VEGF'nin endotel hücrelerinde β -katenin'in kompleksten ayrılmasına ve serbest kalmasına neden olduğunu

göstermiştir. Hücre yapışma birleşiklerinin dağılımı endotel hücrelerinin yeni oluşan damara göçü için gereklidir. Bu da MI sonrası VEGF'nin yeniden damar oluşumunu tetikleyici etkisinin bir şekilde β -katenin'e bağımlı olduğunun göstergesidir.⁶⁶ Bazı *invivo* çalışmalarda MI sonrası yeni damarlanma sırasında β -katenin'in endotel hücrelerinde plazma zarından sitoplazmaya doğru yer değiştirdiği gösterilmiştir. Bu hücrelerde *dv11* ekspresyonu ile aynı anda sitoplazmik β -katenin görülmesi de *wnt-frizzled* yolağının yeniden damarlanma sırasındaki rolünü gösteren bir başka kanıttır.⁶⁷

Endotel hasarı sonrası bu alana nötrofil ve makrofajların göçerek köpük hücrelerine dönüşmesini, düz kas hücrelerinin göçü ve çoğalmasını izleyen süreç sonunda arterlerde sıklıkla yüksek akım ve türbülansın arttığı yan dalların çıkışına yakın yerlerde ateroskleroz gelişir. Endotel hücrelerinde hasarlanma sonrası adheran bağların tamirini de içeren ciddi şekil değişiklikleri oluşur. Yapılan bir çalışmada endotel hasarı sonrası saatler içinde α -katenin ve β -kateninin kavşak pozisyonunda gevşeme ve değişme olduğu ve endotel bariyerinin geçirgenliğinin değişim sürecine *wnt-frizzled* yolağının karıştığı belirlenmiştir.^{68,69} Bir başka çalışma ise aktive edilen nötrofillerin sığır koroner endotel hücre kültürlerinde geçirgenliği arttırdığını göstermiştir.⁷⁰ Bu geçirgenlik artışı nedeniyle adheran bağlarda oluşan değişim sırasında membran boyunca β -katenin ve cadherin tek sıra dizilimden karışık dizilim şekline geçmektedir. Ratlarda aortanın balonla yaralanması suretiyle yapılan deneysel arter yaralanması modelinde *Rfzb-1* ekspresyonunun 2-7 gün içerisinde arttığı, *frizzled-1* ve 2'nin yaralanma sonrası ilk saat içinde düştüğü fakat 2 gün içerisinde yaralanmadan önceki seviyesine geri döndüğü gösterilmiştir.⁷¹ *Duplaa* ve arkadaşları sığır endotel hücre kültüründe *FrzA* analogu *sFrp-1* ekspresyonunun polarize çoğalmayan vasküler endotel hücrelerinde arttığını, polarize olmayan ve çoğalan endotel hücrelerinde ise azaldığını göstermiştir.⁷²

Son yıllarda özellikle kalp krizi sonrası hasarlanmış bölgenin tedavisinde yetişkin kalp kök ya da progenitör hücrelerin kullanılması ve bu hücrelerin erken fetal dönemdeki farklılaşmayı taklit ederek hasara uğramış bölgede yeni hücreleri oluşturmasının sağlanması çok önemli bir gelişmedir.^{73,74} Bu noktada *Wnt*, *Sonic Hedgehog* gibi sinyal yollarındaki mekanizmaların aydınlatılması kardiyovasküler hastalıkların tedavisinin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

5. GEREÇ-YÖNTEM:

Deney Hayvanları:

Çalışmamızda, ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen standart laboratuvar koşullarında beslenen toplam 16 adet erkek Wistar-Albino tipi sıçan denek olarak kullanıldı.

Deney hayvanı olarak sıçan seçilmesinin nedeni; femoral arter kateterizasyon işlemine uygunluğu, Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisipliner Laboratuvarında yetiştiriliyor olması ve miyokard iskemi modellerinde miyokardiyal kollateral dolaşımının daha az olmasıdır.⁷⁵

Sıçanlar standart pellet yemler ile beslendi, su ve yeme işlemleri serbest bırakıldı. Cerrahi işlemden 12 saat önce yeme işlemi kesilerek su serbest bırakıldı.

Preoperatif ve peroperatif dönemde hemodinamik instabilitesi olan (iskemiye bağlı ortalama arteriyel basıncındaki düşüşün 60 mmHg olması) ve deney süresince ölen denekler çalışma dışı bırakıldı.

Anestezi-Moniterizasyon:

Deneklerin anestezisine eterle başlanıp, ketamin ve ksantin (35 mg/kg ve 15 mg/kg, i.m.) ile idame sağlandı. Ardından denekler trakeotomi açılarak entübe edildi ve solunum sayısı 60/dk, %100 oksijen desteğinde 10-15 ml/kg tidal volümde mekanik hayvan respiratörüne (HUGO SACS, rodent ventilator, Germany) bağlandı.

Tidal volüm ve solunum sayısı entübasyondan 15 dakika sonra alınan kan gazı parametrelerinin değerlendirilmesi ile pH'nın 7.3-7.5 aralığında, PaO₂'nin hipoksi gelişmeyecek değerlerde ve PaCO₂'nin 35-45 mmHg aralığında olması sağlandı. Kan gazı 30 dakika sonra bir kez daha bakılıp kan gazı değerleri (PaO₂'nin >90 mmHg, PaCO₂'nin 35-45 mmHg aralığında olması) kontrol edildi.⁷⁹

Fizyolojik Parametrelerin Monitörizasyonu:

Kalp atım hızı, ritim, ortalama arteriyel basınç monitörden sürekli takip edilerek iskeminin 0.-15.-30. dakikalarında kaydedildi. Ayrıca rektal vücut sıcaklığı iskeminin 0.-15.-30. dakikalarında ölçüldü. Parsiyel arteriyel karbondioksit basıncı (PaCO₂), parsiyel arteriyel oksijen basıncı (PaO₂), pH, Hematokrit, laktat, glukoz için arteriyel kan gazı alınarak entübasyon sonrası 15-30. dakikada bakılıp kan gazı normal değerlerinin korunması sağlandı.

Hayvan Çalışma Grupları:

Denekler randomize olarak iki gruba ayrıldı.

1. *Sham grubu* ($n=8$); Deneklere uygulanan tüm cerrahi girişim ve cerrahi işlemler yapıldı. Fakat kalbe ulaşıldığında LAD (Left anterior descending) koroner arter oklüzyonu yaratılmadı. Daha önce belirlenen bölgelerden doku örnekleri 30 dakika sonra alınarak deneklerin kalpleri histopatolojik inceleme için patolojiye gönderildi.

2. *Çalışma grubu* ($n=8$); LAD (Left anterior descending) ilk diagonal yan dalını verdikten sonra 6-0-10 mm'lik prolens suture ile bağlanarak oklüzyon yaratıldı. 30 dakika iskemi sonrası doku örnekleri belirlenen bölgelerden alınarak deneklerin kalpleri histopatolojik inceleme için patolojiye gönderildi.

Cerrahi İşlem:

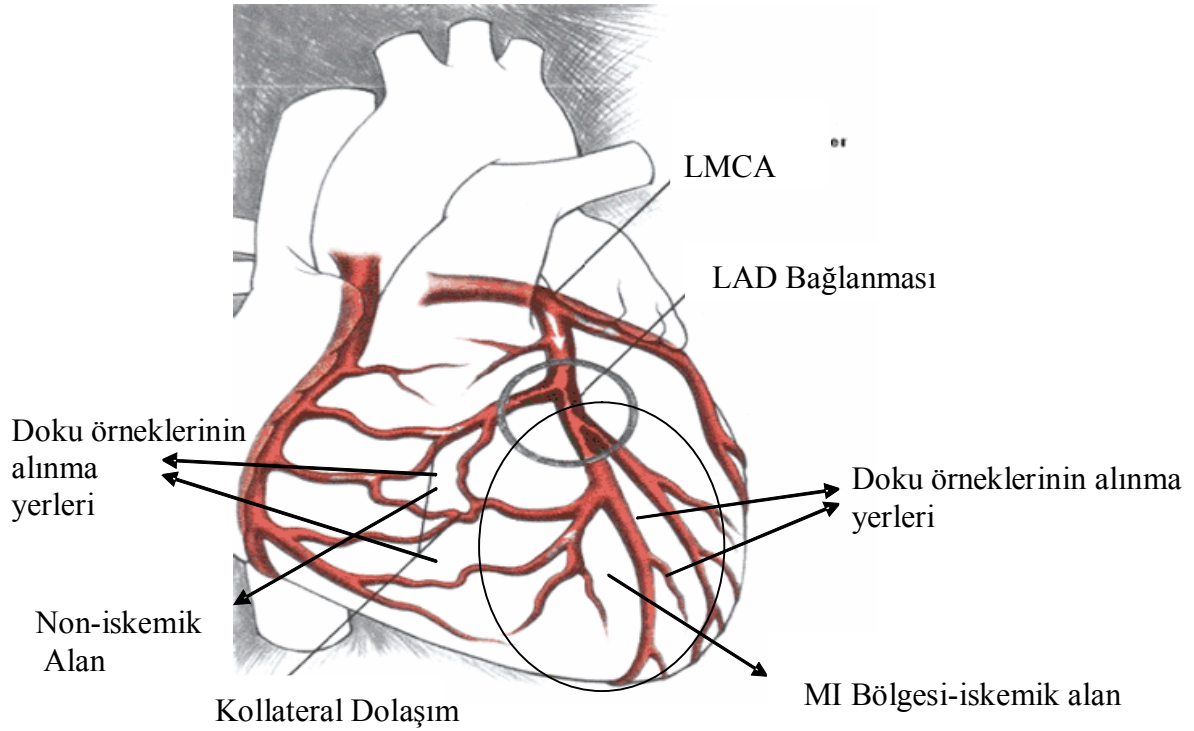
Denekler yeterli anestezi derinliği sağlandıktan sonra supin pozisyonda yatırıldı. Denekler trakeotomi açılıp entübe edilerek hayvan respiratörüne bağlandılar. Solunum sayısı 60/dk, tidal volüm 10-15 ml/kg olacak şekilde ayarlandı. EKG'nin görüntülenmesi için ekstremitelerine DI-DII-DIII derivasyonlarının elektrotları yerleştirildi. Kasık ve göğüs ön duvarı tıraş edilip batikonla silindi. Sağ karotis arteri devamlı basınç monitörizasyonu için 24G kateeter ile, sol femoral ven de hidrasyon için 24G kateeter ile kateterize edildi.

Kalbe ulaşmak için 4. interkostal aralıktan sol anterolateral torokotomi yapıldı ve perikardiyotomi sonrası ekartör konularak ekspozyon sağlandı. Koroner arterlere tromboz oluşumunu önlemek amacıyla kg başına 600 IU heparin intravenöz yolla verildi. 6-0-10 mm'lik aseptik iğneli suture materyali ile; sol ana koroner arterin kalbin ön yüzündeki interventriküler septum trasesi boyunca ilerleyen left anterior descending (LAD) dalı ilk diagonal yan dalını verdikten sonra mid LAD bölgesinden intramiyokardiyal geçirilip çalışma grubunda bağlanarak oklüde edildi. Kontrol grubunda ise çalışma grubunda tanımlanan alandan 6-0-10 mm'lik aseptik iğneli suture materyali geçirildi, fakat koroner oklüde edilmedi. Bu işlem sırasında deneklerden herhangi birinde buna bağlı ortalama arteriyel basınçtaki düşüş 60 mmHg olması durumunda çalışmadan çıkartıldı. Miyokardiyal iskemi oluşturulan alanda meydana gelen bölgesel hipokinezi ve EKG'de gözlenen aritmiler her

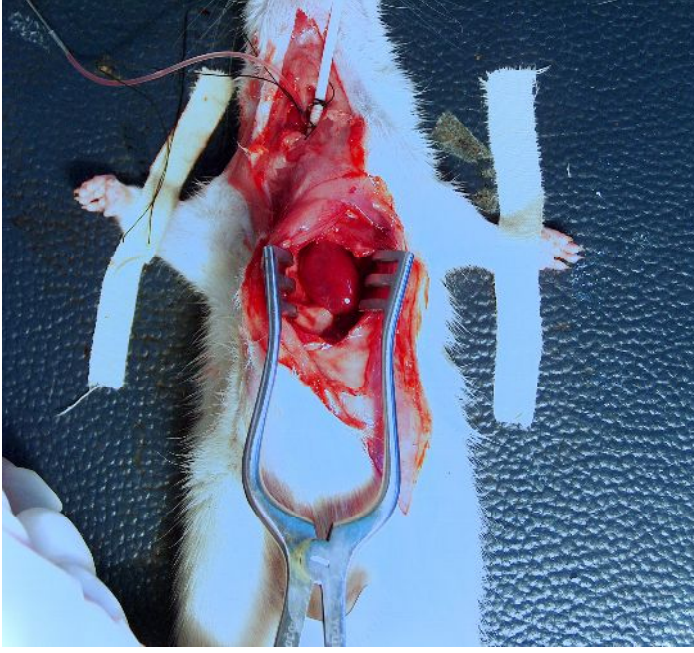
denek için kaydedildi. Sıvı uygulaması, işlemler sırasında tahmini kaybedilen kanın üç katı olacak biçimde Ringer Laktat ile İV olarak yapıldı.

Deneklerde 30 dakika iske mi döneminden sonra belirlenen (Şekil 5) iskemik ve non-iskemik bölgelerden alınan yaklaşık 10 mm³ lük doku örnekleri derhal fosfat tuz solusyonunda yıkanıp, sıvısı kurutma kâğıdına emdirildikten sonra, RNA bütünlüğünü sağlamak amacıyla, RNAlater® solusyonu içerisine konularak, moleküler biyoloji laboratuvarına götürülüp, -80 °C’de saklandı. Doku örnekleri alındıktan sonra denekler yüksek doz (90 mg/kg) İV pentotal anestezisi uygulanarak sakrifiye edilerek kalp çıkartıldı. Çıkarılan kalp dokusu histopatolojik çalışma için %10 tamponlu formalin içine alınıp inceleme için patoloji laboratuvarına götürüldü.

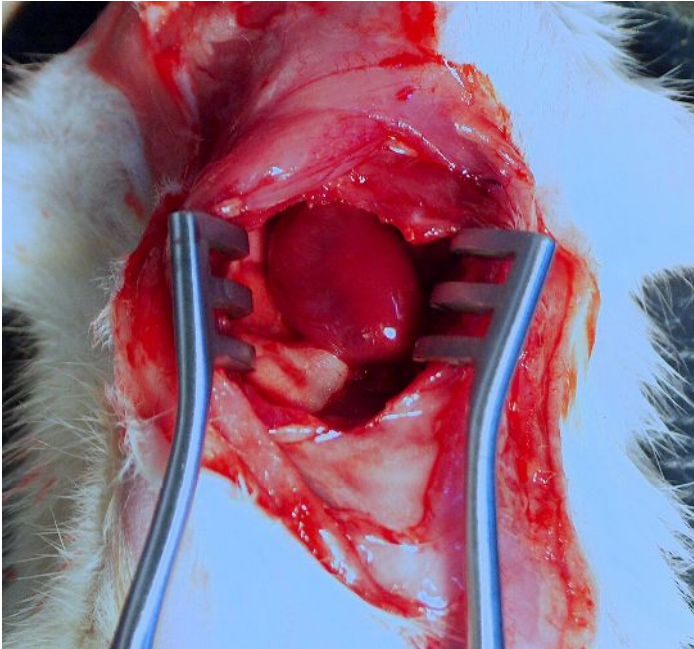
Cerrahi işlem sırasında yapılan uygulamalar şematik olarak aşağıda gösterilmiştir (Şekil 5-10).



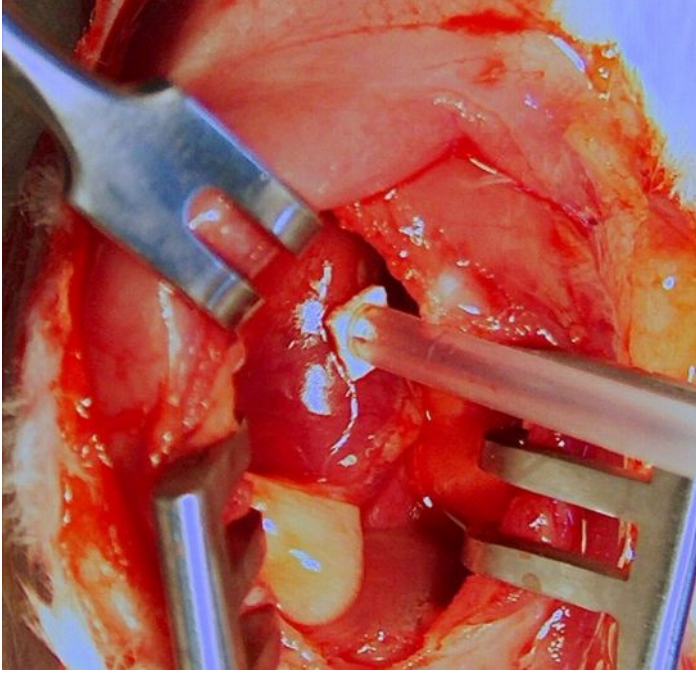
Şekil 5: Cerrahi işlemin şematik görünümü.



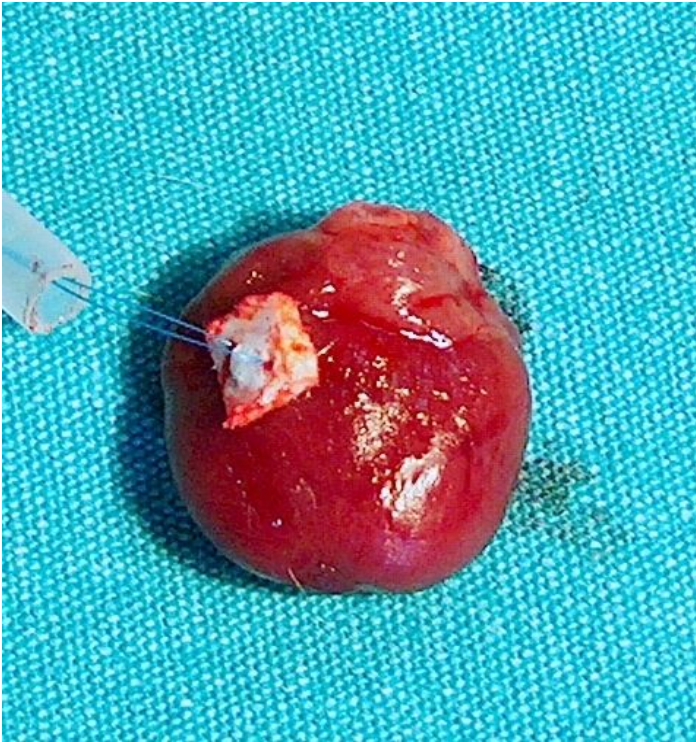
Şekil 6: Deneklerin trakeotomi açılıp sağ karotis arterden arteriyel kanül yerleştirilmiş ve sol anterolateral torakotomi yapılarak cerrahi işleme hazırlanmış şekli.



Şekil 7: Denek kalplerinin cerrahi işlem için eksplere edilmiş şekli.



Şekil 8: Çalışma grubunda LAD'nin bağlanıp iskeminin yaratılmış hali.



Şekil 9: Denek kalbinin çıkarılmış hali.



Şekil 10: Doku kesitleri alınan denek kalbi.

Histopatolojik Değerlendirme:

%10 tamponlu formalin içine alınıp inceleme için patoloji laboratuvarına götürülen denek kalplerinden alınan paralel örnekler ayrı ayrı %10 formol-saline ile fikse edildi, kademeli alkol serileri yoluyla dehidrate edilerek xylene içinde temizlendi ve parafin (erime noktası 56 °C) içine gömüldü. Beş µm kalınlığında seri parçalar kesildi, hemotoksilen ve eosin (HE) ile boyandı ve histopatolojik değişikliklerin değerlendirilmesi için kullanıldı. Kesilen bu parçalar ayrıca kollajen boyanması için Masson's Trichrome (MT)'a kondu. Parçalar ışık ve elektron mikroskobu altında incelendi. Enfarktlı zonun histolojik analizi doku içeriğinde anormal rejyonel vakualizasyon, miyofiber organizasyon bozukluğu, interstisiyel hemorajik odakların varlığı, yaygın disorganize interstisiyel doku ve kontraksiyon bant nekrozu içeren sarkomerik organizasyonun global bozulması olarak değerlendirildi. (Kontraksiyon band nekrozu; ölüme giden hücrede, miyofibrillerde gelişen hiperkontraksiyondur. Miyofibrillerde bant şeklinde koyu eozinofilik boyanma şeklinde izlenir.)

Araştırma sonuçlarının değerlendirilmesi için kullanılacak istatistiksel yöntem:

İstatistiksel analiz; SPSS için Windows istatistik programının 10.0 versiyonu kullanılarak yapıldı. Cerrahi işlem sırasındaki kaydedilmiş monitörizasyon verileri ortalama \pm standart sapma biçiminde verildi. Gruplar arası ve grup içi karşılaştırmalarda non-parametrik analiz yapıldı. Mann-Whitney U ve Fredman testleri kullanıldı.

Gen Ekspresyonu Analizleri:

Dokulardan RNA izolasyonunun yapılması:

RNAlater® içinde -80 °C'de saklanan kalp dokuları, erimelerine izin verilmeden alüminyum folyo arasında, sıvı nitrojen içinde havanda vurularak ezildi. Ezilen dokulardan, Qiagen RNeasy Fibroz dokudan RNA izolasyonu kitinde (Qiagen katalog no 74704) önerilen şekilde total RNA eldesi yapıldı. Bunun için, ezilen dokular 300 μ l lizis tamponu içerisinde 20 gauge iğne uçlu enjektörden en az beş kere geçirilerek homojenize edildi. Homojenat Proteinaz K ile inkübe edildi ve RNeasy Mini Spin kolonundan geçirildi. RNeasy Mini Spin kolonu içindeki silika jel membrana tutunan genomik DNA'yı uzaklaştırmak için DNase I ile inkübasyon yapıldı. Silika jel membrana tutunan RNA, 30 μ l RNase-free distile su içinde çözüldü. RNA örnekleri sıvı nitrojenle aniden dondurularak, -80 °C'de saklandı.

RNA Miktar Tayini:

-80 °C'den çıkarılan RNA'lar buz içerisinde eritilerek, 10 mM pH:8.0 Tris solusyonu içerisinde 1:1000 oranında seyreltildi. Örnekler ve kör için, UV geçirgen quartz küvetler içinde spektrofotometrik olarak 260 ve 280 nm'de optikal dansite (Absorbance (A)) ölçümleri yapıldı (Pharmacia Biotech, Ultraspec 2000). Aşağıdaki formül kullanılarak, RNA miktar tayinleri ve A_{260}/A_{280} değerleri kullanılarak ise RNA kalitesinin değerlendirilmesi yapıldı.

$$A_{260} \times 44 \times (\text{dilüsyon faktörü}) = \dots \mu\text{g/ mL}$$

Tek iplikli cDNA Eldesi:

4 μ g total RNA'dan, MBI Fermentas RevertAid® First Strand cDNA Sentezi kiti (K1622)'n de önerilen şekilde, "random hexamer" ve MMLV tersten transkriptaz enzimi kullanılarak tek iplikli cDNA elde edildi.

Primer dizilerinin hazırlanması:

Gen ekspresyonu analizi için kullanılacak primer dizileri, olası bir genomik DNA kontaminasyonunu görebilmek amacıyla, her gen için arasında en az bir intron içerecek şekilde, farklı ekzonik DNA dizilerinden Primer3 programında hazırlandı ve VBC genomics firmasına sentezlettiler.

Yarı- kantitatif RT-PCR (Tersten transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu):

Hedef genlerde transkript düzeyinde ekspresyon değişimi olup olmadığını değerlendirmek amacıyla RT-PCR yöntemi kullanıldı. Bunun için kullanılan genler ve primer çiftleri Tablo 4’de görülmektedir. Amplifikasyon döngüsü, 94 °C’de beş dakikalık bir denatürasyon aşamasını izleyen, 94 °C’de 30 sn. her gen için Tablo 4’de belirtildiği ısıda 30 sn. ve 72 °C’de 30 sn.’den oluşan her gen için aynı tabloda belirtilen sayıda birbirinin tekrarı sikluslar ve sonrasındaki 72 °C’de 10 dk.’lik son uzatma evresini içerir. Tüm PCR reaksiyonları üç kez tekrarlandı.

PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezi ile ayrıldıktan sonra Stratagene Eagle Eye® Görüntüleme Sistemi kullanılarak jel görüntüleri elde edildi. PCR ürünlerine ait bantlar Bio-Rad Multi-Analyst® 1.1 analiz programı kullanılarak densitometrik olarak ölçüldü ve yarı-kantifiye edildi.

Tablo 4: PCR’da kullanılan primer dizileri, optimize edilmiş yapışma ısıları (Ta), reaksiyonda kullanılan Mg Cl₂ konsantrasyonları ve siklus sayıları.

Gen	Düz Primer (5’-.....-3’)	Ters Primer (5’-.....-3’)	Ta (°C)	MgCl ₂ (mM)	Siklus sayısı
Wnt5a	CTAATGGCTTTGGCCACATT	GCGGTAGCCATAGTCGATGTTGTC	55	1.5	34
Wnt9a	TGTGGGGACAACCTCAAGTA	GGGAGAGTCGTCCAGGTGTA	55	1.5	33
Fzd2	ACATCGCCTACAACCAGACC	CTCGCCCAGAACTTGTAGC	55	1.5	32
sFrz1	TCTTCCTCTGCTCGCTCTTC	GTGGGACACTCGTGGTTTTT	55	1.5	33
Dact1	CTCCGGGTCCCTTCTAAC	GCGTGAAGTGGACTGGGATAC	52	1.5	33
Axin	AGAACCCTGAGAGCATCCTGGA	CCTCAATGATCCACTGCATGAT	58	1.5	31
TCF4	CACAGCTGTTTGGTCTCGAA	GGTCAGGTCCTCATCATCGT	55	1.5	30
GAPDH	GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAT	CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA	56	3.0	25

Tablo 5 : PCR reaksiyon içeriđi

İçerik	Firma	Stok Konsantrasyonu	Son Konsantrasyonu
10X PCR buffer	MBI Fermentas	10X	1X
MgCl ₂	MBI Fermentas	25 mM	1.5/3.0 mM
dNTP	MBI Fermentas	10 mM	200 µM
Düz Primer	VBC Genomics	5 pmol/µl	5 pmol
Ters Primer	VBC Genomics	5 pmol/µl	5 pmol
DNA Taq polymeraz enzimi	MBI Fermentas	5 U/µl	1.25 U

GAPDH (Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz) normalizasyonu ve gen düzeylerinin karşılaştırılması:

Gen düzeyleri karşılaştırılacak örneklerde cDNA havuzunun aynı olup olmadığını anlamak için, her hücrede aynı miktarda olduğu bilinen geni için tabloda belirtilen primer dizileri ve ısı kullanılarak PCR yapıldı. Sonrasında incelenecek özgül genler için GAPDH PCR'ında kullanılan ile aynı cDNA örnekleri kullanılarak Tablo 5'de belirtilen şekilde PCR'ler yapıldı ve PCR ürünlerinin agaroz jelindeki band kalınlıkları densitometrik olarak karşılaştırıldı.

6. BULGULAR:

1. Vital bulgular:

Miyokardiyal iskemi oluşturulan çalışma grubunda hemodinamiyi etkilemeyen VF (Ventriküler fibrilasyon), VT (Ventriküler taşikardi), bradikardi ve SVT (Supraventriküler taşikardi) şeklinde aritmiler izlendi. VT % 75 (6/8), VF % 87.5 (7/8), bradikardi % 100 (8/8) ve SVT % 87.5 (7/8) oranında kaydedildi. Kontrol grubunda ise aritmi izlenmedi.

Tüm deneklerin (n=16) ortalama \pm standart sapma olarak hesaplanan arteriyel kan gazı değerleri tablo 6'da sunulmuştur. Bu değerler istatistiksel olarak incelendiğinde pH, Htc, K⁺, Laktat değerleri açısından anlamlı fark tespit edildi. (Sırasıyla p=0.006, p=0.018, p=0.01, p=0.004, p< 0.05).

Tablo 6: Çalışma ve kontrol grubunun 0.-15.30. dk ortalama kan gazı değerleri ortalaması.

	Kontrol grubu (n=8)			Çalışma grubu (n=8)			Toplam (n=16)		
	0.dk	15.dk	30. dk	0. dk	15.dk	30. dk	0.dk	15.dk	30.dk
pH	7.53	7.47	7.46	7.44	7.42	7.40	7.48	7.45	7.43
PO ₂	242.81	209.16	189.51	169.76	104.04	110.93	206.29	156.60	150.22
PCO ₂	35.65	33.45	33.83	37.61	36.54	35.50	36.63	34.99	34.66
Htc	35.63	35.25	33.63	35.25	33.25	32.00	35.44	34.25	32.81
Na ⁺	146.38	142.88	143.38	143.88	143.00	144.00	145.13	142.94	143.69
K ⁺	3.73	4.00	3.97	3.96	4.33	4.35	3.84	4.16	4.16
Ca ⁺	0.75	0.84	0.84	0.94	0.89	0.92	0.84	0.87	0.88
Glukoz	195.88	217.50	197.63	201.75	212.50	220.63	198.81	215.00	209.13
Laktat	1.41	1.85	2.21	4.26	4.88	4.92	2.83	3.36	3.56
% O ₂	99.45	99.53	99.05	99.37	98.66	98.70	99.41	99.10	98.87

Deneklerin 0.-15.-30. dakikalarda kaydedilen TA ve HR değerleri tablo 7 ve 8'de ortalama \pm standart sapma şeklinde sunuldu. Tüm deneklerin (n=16) TA ve HR 0.-15.-30. dk

değerlerinin istatistiksel analizi yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0.05$).

Tablo 7: Çalışma ve kontrol grubunun 0.-15.-30. dk ortalama TA ve HR değerleri

	Kontrol grubu			Çalışma grubu			Toplam (n=16)		
	0.dk	15.dk	30. dk	0. dk	15.dk	30. dk	0.dk	15.dk	30.dk
TA(mmHg)	85.93	84.10	73.39	62.38	66.12	61.66	74.16	75.11	67.53
HR(/dk)	253.13	275.00	221.25	199.38	183.13	170.00	226.25	229.06	195.63

Tablo 8: Tüm deneklerin TA ve HR 0.-15.-30. dk değerlerinin ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerlerinin analizi

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
TA-O. dk	16	74,163	18,2048	47,0	117,0
TA-15. dk	16	75,113	20,2398	42,3	104,0
TA-30. dk	16	67,53	12,602	41	83
HR-0. dk	16	226,25	57,749	90	300
HR-15. dk	16	229,06	63,462	140	360
HR-30. dk	16	195,63	52,658	120	330

Çalışma ve kontrol grubu kendi içinde arteriyel kan gazı değerleri açısından analiz edildiğinde: çalışma grubunda (n=8); 0.-15.-30. dk glukoz değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilirken ($p=0.03$, $p<0.05$), kontrol grubunda (n=8); pH, Na^+ , lac değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi (Sırasıyla; $p=0.034$, $p=0.030$, $p=0.012$, $p<0.05$).

Vital bulgular ve arteriyel kan gazı değerleri için yapılan istatistiksel analizler sonucunda iki grup arasında 0. dk TA (62.38 ± 11.31 ; 85.93 ± 16.28 , $p<0.05$, çalışma; kontrol), 15.dk HR (183.13 ± 24.63 ; 275.00 ± 56.56 , $p<0.05$, çalışma; kontrol), 30. dk HR (170.00 ± 32.40 ; 221.25 ± 58.23 , $p<0.05$, çalışma; kontrol), 0. dk pH (7.44 ± 0.07 ; 7.53 ± 0.03 , $p<0.05$, çalışma; kontrol), 15. dk PO_2 (104.04 ± 17.66 ; 209.16 ± 91.22 , $p<0.05$, çalışma; kontrol), 0. dk lac (4.26 ± 2.84 ; 1.41 ± 0.67 , $p<0.05$, çalışma; kontrol), 15.dk lac (4.88 ± 1.33 ; 1.85 ± 0.93 , $p<0.05$, çalışma; kontrol), 30. dk lac (4.92 ± 1.34 ; 2.21 ± 0.93 , $p<0.05$, çalışma; kontrol)

ve 15. dk % O₂ sat. (98.66 ± 0.74; 99.53 ± 0.26, p<0.05, çalışma; kontrol) değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi. K⁺ ve laktat yüksekliği ile PO₂ ve O₂ saturasyon düşüklüğü çalışma grubunda oluşturulan iskeminin etkisine bağlandı.

2. Histopatolojik bulgular:

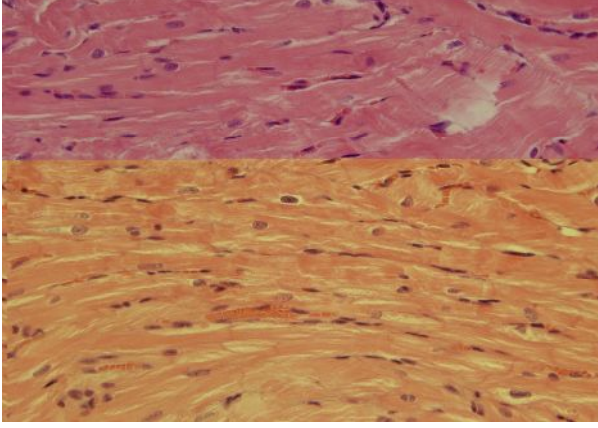
Kontrol ve çalışma grubundan alınan kesitler Hematoksilen Eosin ve Masson trikrom boyaları ile X 400 büyütmede ayrı ayrı boyanarak değerlendirildi.

Enfarktlı zonun histopatolojik analizi doku içeriğinde anormal rejyonel vakualizasyon, miyofiber organizasyon bozukluğu, interstisiyel hemorajik odakların varlığı, yaygın disorganize interstisiyel doku ve kontraksiyon bant nekrozu içeren sarkomerik organizasyonun global bozulması olarak değerlendirildi. Yapılan bu değerlendirmenin sonucunda çalışma grubundaki tüm deneklerde (%100) kontraksiyon bandı ve konjesyon izlenirken, sadece bir denekte (%12.5) hemorajik odak izlendi. Bu veriler ışığında çalışma grubundan alınan kesitlerde deneklerde iskemi yaratıldığı histopatolojik olarak tespit edilmiştir. Deneklerin yapılan histopatolojik incelemeleri Tablo 9'da özetlenmiştir.

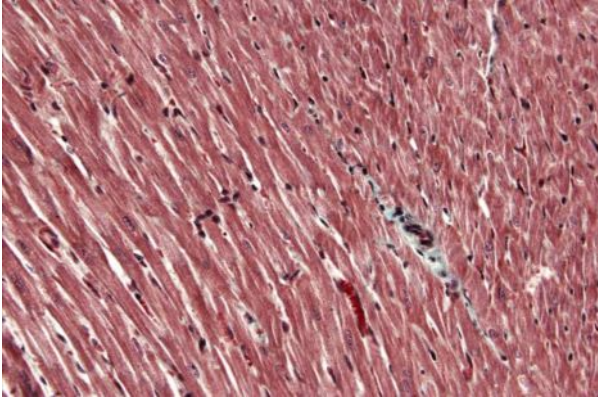
Tablo 9: Kontrol ve çalışma grubunun histopatolojik incelenmesi.

Denek no	Myokard fibrillerinde değişiklik	Damar değişiklikleri	ödem	kanama	Hücre infiltrasyonu	Koagülasyon nekrozu
Kontrol 1	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi
Kontrol 2	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi
Kontrol 3	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi
Kontrol 4	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi
Kontrol 5	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi
Kontrol 6	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi
Kontrol 7	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi
Kontrol 8	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi
Çalışma 1	Kontraksiyon bandı	konjesyon	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi
Çalışma 2	Kontraksiyon bandı	konjesyon	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi
Çalışma 3	Kontraksiyon bandı	konjesyon	görülmedi	kanama	görülmedi	görülmedi
Çalışma 4	Kontraksiyon bandı	konjesyon	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi
Çalışma 5	Kontraksiyon bandı	konjesyon	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi
Çalışma 6	Kontraksiyon bandı	konjesyon	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi
Çalışma 7	Kontraksiyon bandı-hafif	Konjesyon-hafif	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi
Çalışma 8	Kontraksiyon bandı-hafif	konjesyon	görülmedi	görülmedi	görülmedi	görülmedi

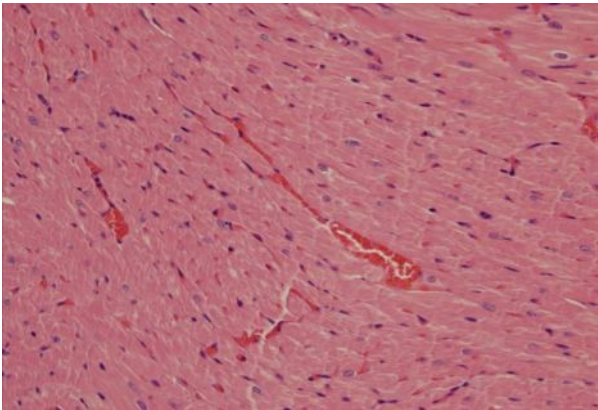
Aşağıda kontrol ve çalışma gruplarına ait H&E ve Masson trikrom ile boyanarak yapılan histopatolojik kesitler verilmiştir (Şekil 11-18).



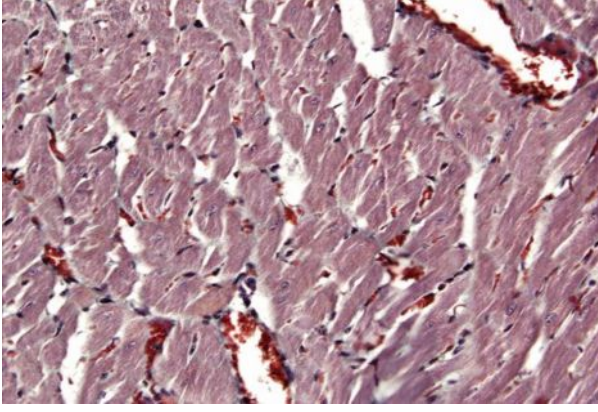
Şekil 11: (Kontrol 1) Kalp kası normal özellikte. H&E x400



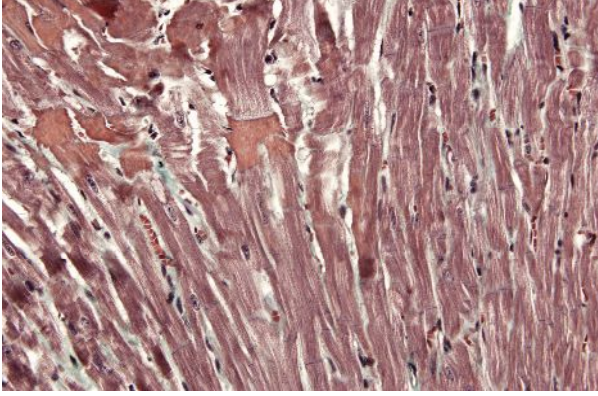
Şekil 12: (Kontrol 1) Kalp kası normal özellikte. Masson trikrom x400



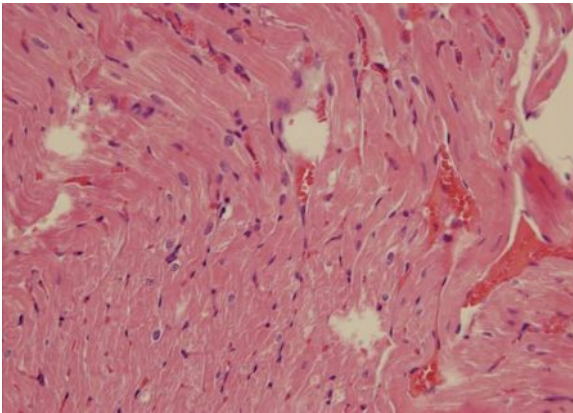
Şekil 13: (Çalışma 1) Konjesyon. H&Ex400



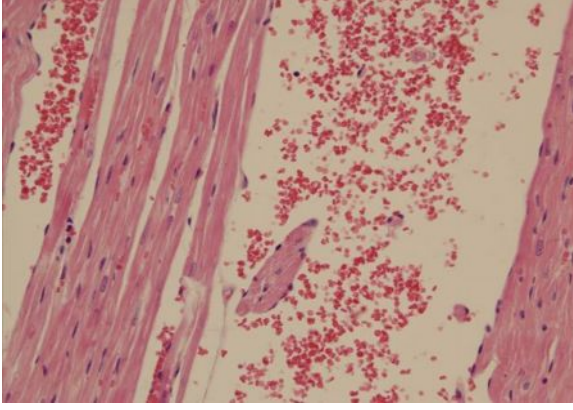
Şekil 14: (Çalışma 1) Konjesyon. Masson trikromx400



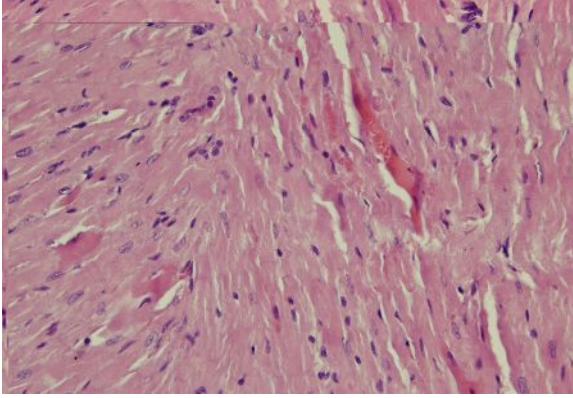
Şekil 15: (Çalışma 1) Miyofibrillerde kontraksiyon bandı. Masson trikrom x400



Şekil 16: (Çalışma 2) Konjesyon. H&Ex400



Şekil 17: (Çalışma 3) Kanama. H&Ex400



Şekil 18: (Çalışma 3) Kontraksiyon bandı, konjesyon. H&Ex400

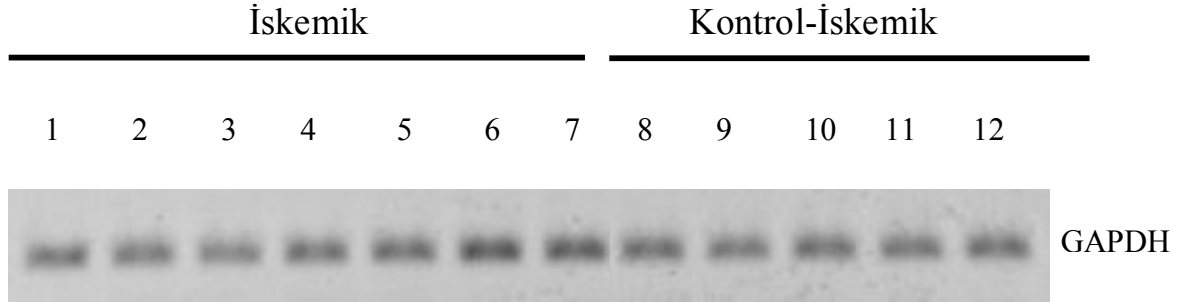
3. Gen Analiz Sonuçları:

Gen analizlerinde Wnt/Frizzled sinyal ileti yolağını aktive eden Wnt proteinleri içinden Wnt9a'nın, membranda yerleşik reseptör proteinlerden Frizzled-2'nin, Wnt yada frizzled proteinlerine bağlanarak antagonistik etki yapabilen sFRP1'in, sinyal iletiminin aktive olmasıyla ekspresyonu düzenlenen Axin proteininin ve sinyal yolağının son aşamasında uyarılan TCF4 transkripsiyon faktörünün ekspresyon düzeyleri değerlendirmeye alınmıştır.

GAPDH normalizasyonu:

LAD'si bağlı olan ve olmayan sıçanlardaki iskemik ve non-iskemik bölgelerden alınan her bir dokudan elde edilen cDNA havuzlarının eşit olup olmadığına bakmak için, bir housekeeping gen olan GAPDH'den özgül primerler ile PCR sonucu Şekil 19'da

görülmektedir. Densitometrik analiz sonucunda örneklerdeki GAPDH gen ürünlerinin hemen hemen aynı olduğu hesaplandı (Şekil 20). Buna göre, deney ve kontrol gruplarında bu yöntem ile bakılacak herhangi bir gen ekspresyon seviyesindeki değişimin sadece deney etkisi ile olduğu söylenebilecektir.



Şekil 19: Deney ve Kontrol gruplarında GAPDH gen ürünleri

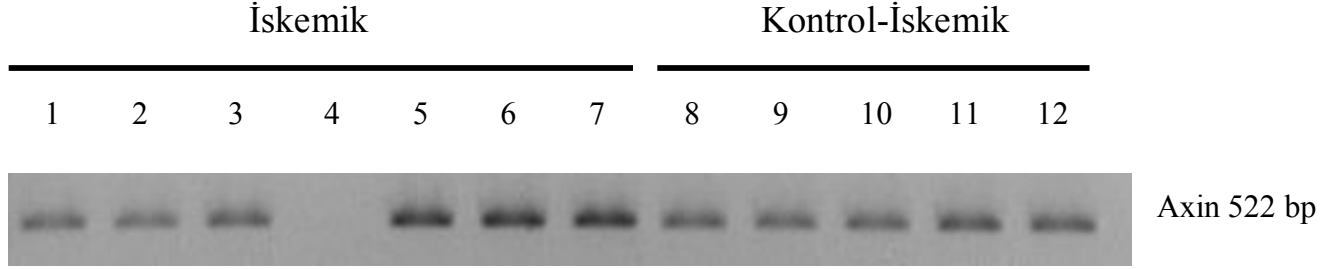
Örnek Adı	Düzeltilmiş GAPDH Değeri
1	1
2	0,9698
3	0,9113
4	1,0352
5	1,0932
6	1,2408
7	1,1902
8	1,0909
9	1,0144
10	1,0783
11	1,0383
12	1,0810

Şekil 20: Deney ve Kontrol gruplarında GAPDH gen ürünlerinin densitometrik analizleri

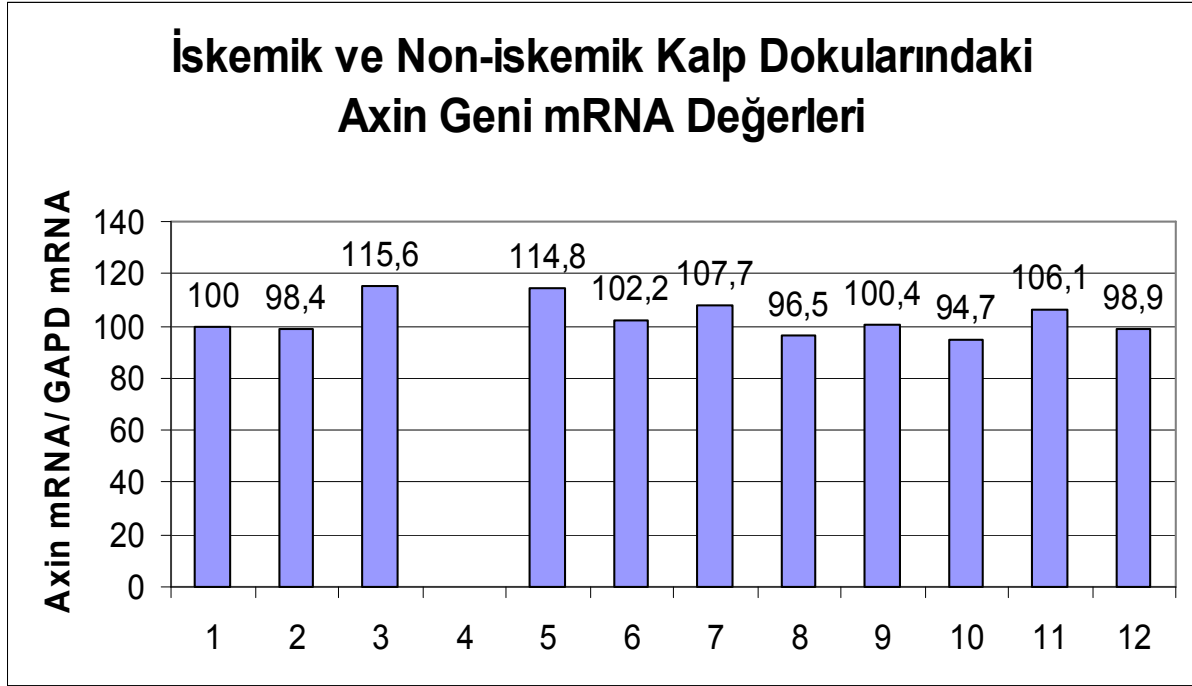
Axin:

Axin geni mRNA'sına özgül primerler ile cDNA üzerinden hedef bölgenin kopya sayısı, PCR ürünlerine ait bantların densitometrik olarak ölçülmesi ile değerlendirildi. PCR

ürünlerinin agaroz jelindeki görüntüleri (Şekil 21) ve densitometrik ölçüm sonuçları (Şekil 22) aşağıda gösterilmektedir.



Şekil 21: Deney ve kontrol gruplarında Axin gen ürünleri.



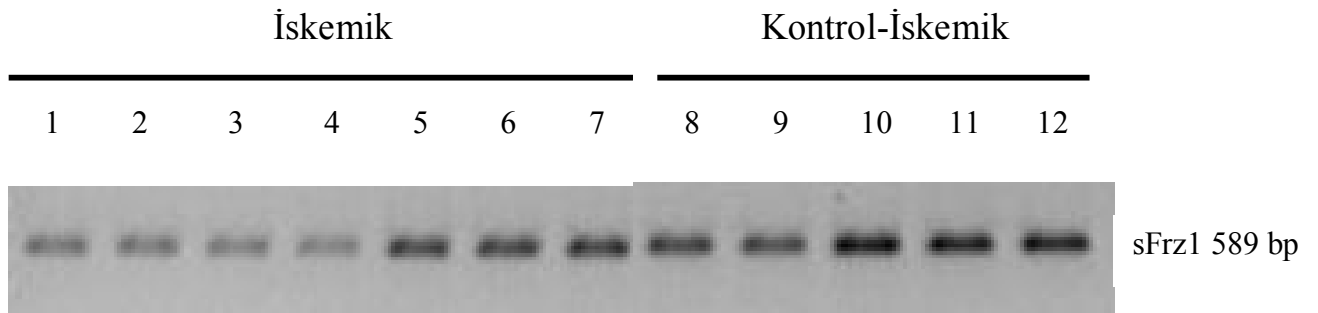
Şekil 22: Deney ve kontrol gruplarında iskemik ve kontrol iskemik dokularda Axin geni mRNA değerleri.

İskemik dokulardaki Axin geni mRNA değerleri ortalaması 106, kontrol-iskemik dokuların ortalaması ise 100'dur. Axin geni mRNA düzeyi iskemik kalp dokusu ve kontrol - iskemik kalp dokusunda birbirine yakın düzeyde bulunmaktadır. Buna göre Axin gen

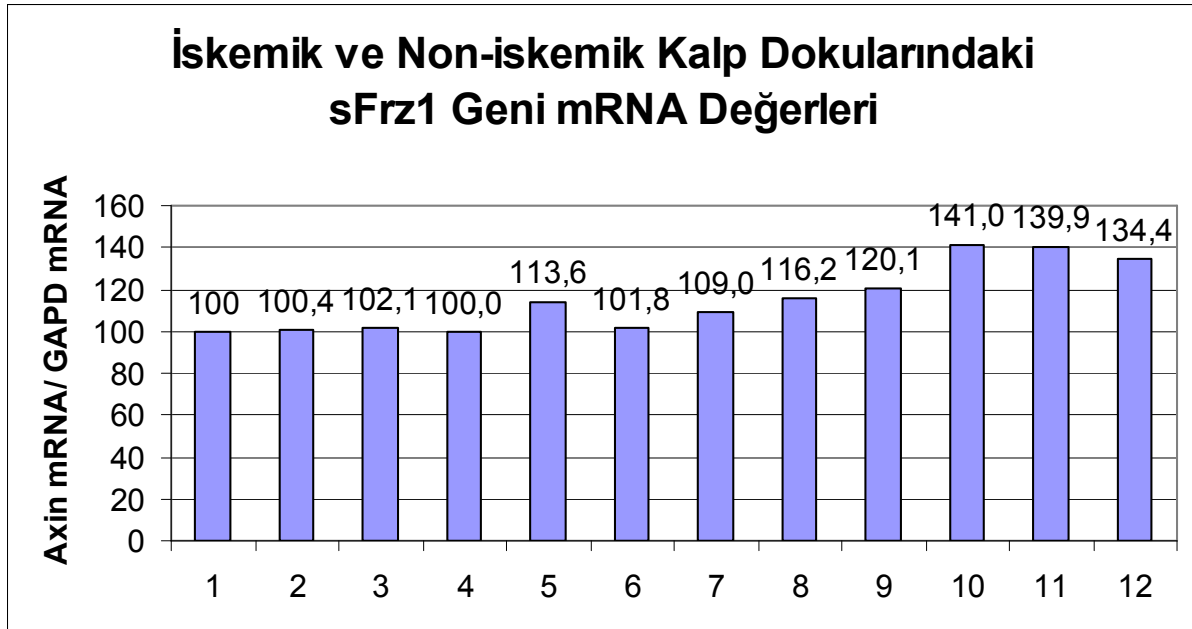
ekspresyonunda sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan miyokardiyal enfarktüs sonucunda bu koşullarda değişime rastlanmamıştır.

Sekrete Edilen Frizzled 1:

Sekrete edilen Frizzled 1 geni mRNA'sına özgül primerler ile cDNA üzerinden hedef bölgenin kopya sayısı, PCR ürünlerine ait bantların densitometrik olarak ölçülmesi ile değerlendirildi. PCR ürünlerinin agaroz jelindeki görüntüleri (Şekil 23) ve densitometrik ölçüm sonuçları (Şekil 24) aşağıda gösterilmektedir.



Şekil 23: Deneysel ve kontrol gruplarında sFRZ1 gen ürünleri

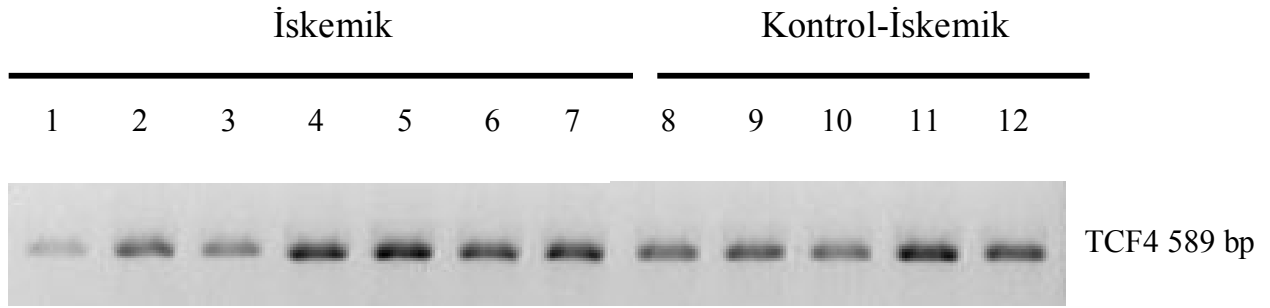


Şekil 24: Deneysel ve kontrol gruplarında sFRZ1 gen ürünlerinin densitometrik analizi

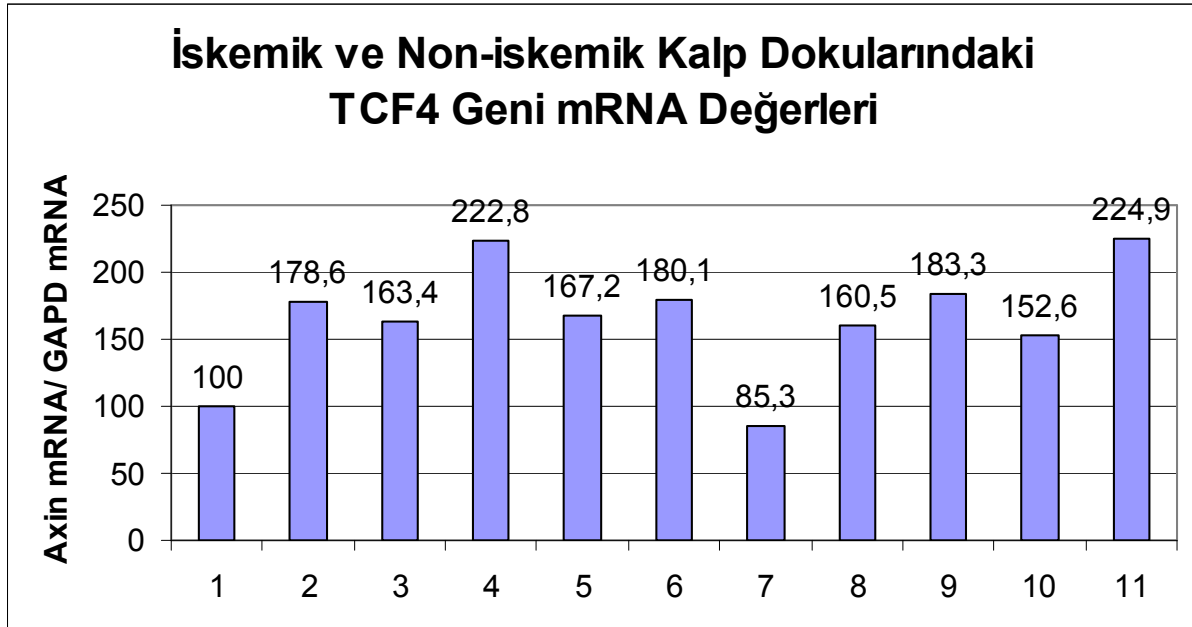
İskemik dokulardaki sFrz1 geni mRNA değerleri ortalaması 104, kontrol-iskemik dokuların ortalaması ise 130'dur. Buna göre, sFRZ1 gen ekspresyonunda sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan miyokardiyal enfarktüse bağlı olarak azalma olmuştur.

TCF4 :

TCF4 geni mRNA'sına özgül primerler ile cDNA üzerinden hedef bölgenin kopya sayısı, PCR ürünlerine ait bantların densitometrik olarak ölçülmesi ile değerlendirildi. PCR ürünlerinin agaroz jelindeki görüntüleri (Şekil25) ve dansitometrik ölçüm sonuçları (Şekil 26) aşağıda gösterilmektedir.



Şekil 25: Deney ve kontrol gruplarında TCF4 gen ürünleri.

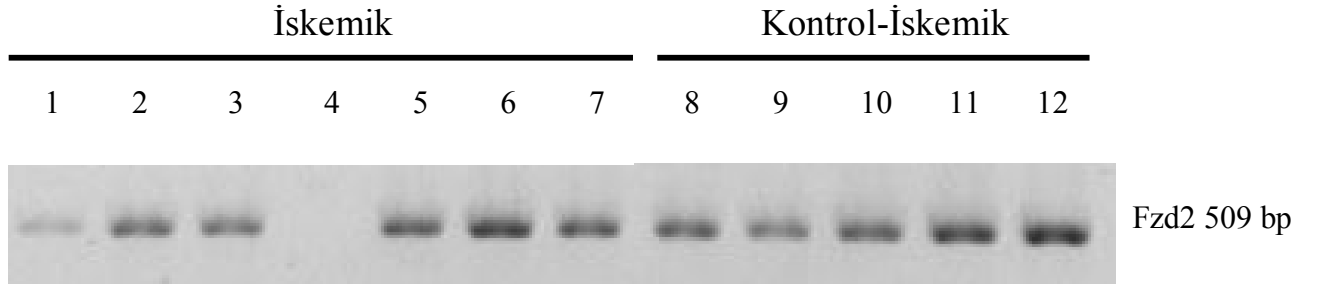


Şekil 26: Deney ve kontrol gruplarında TCF4 gen ürünlerinin densitometrik analizi

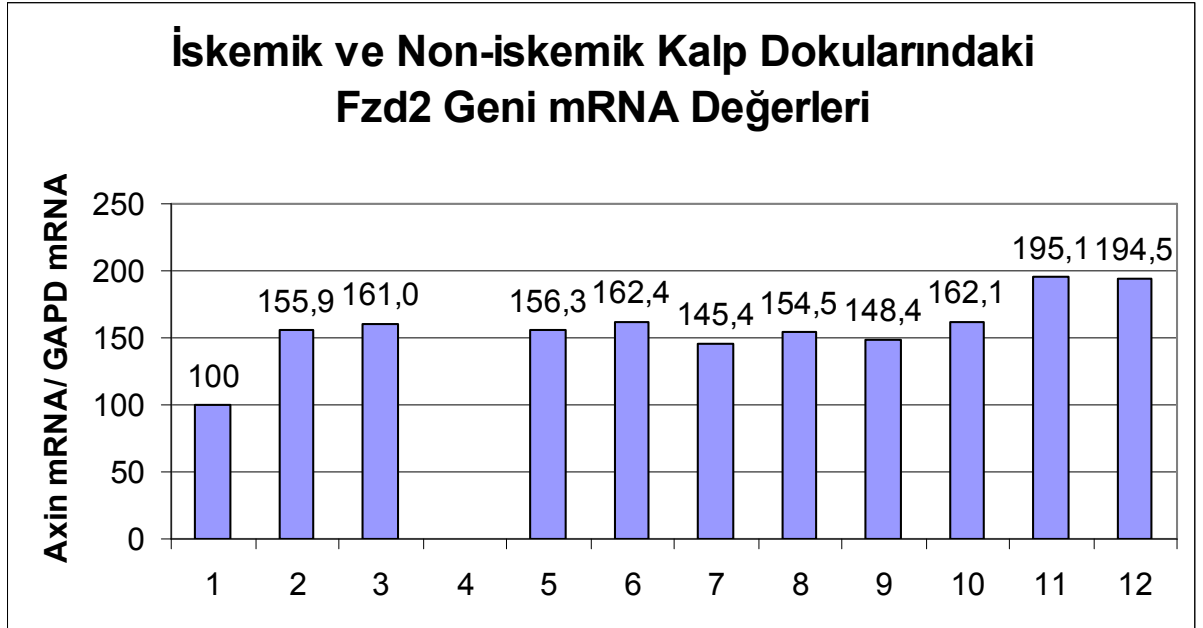
İskemik dokulardaki TCF4 geni mRNA değerleri ortalaması 170, kontrol-iskemik dokuların ortalaması ise 182'dir. Buna göre TCF4 gen ekspresyonunda sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan miyokardiyal enfarktüs sonucunda bu koşullarda değişime rastlanmamıştır.

Fzd2:

Fzd2 geni mRNA'sına özgül primerler ile cDNA üzerinden hedef bölgenin kopya sayısı, PCR ürünlerine ait bantların densitometrik olarak ölçülmesi ile değerlendirildi. PCR ürünlerinin agaroz jelindeki görüntüleri (Şekil 27) ve densitometrik ölçüm sonuçları (Şekil 28) aşağıda gösterilmektedir.



Şekil 27: Deneysel ve kontrol gruplarında Fzd2 gen ürünlerinin densitometrik analizi

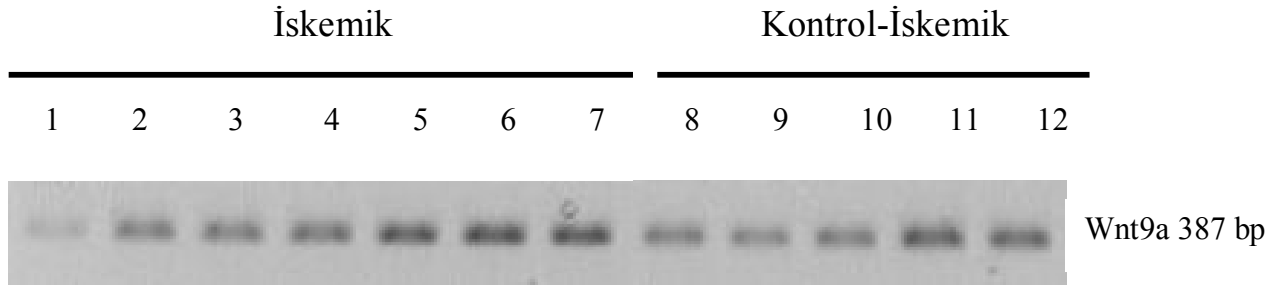


Şekil 28: Deneysel ve kontrol gruplarında Fzd2 gen ürünlerinin densitometrik analizi

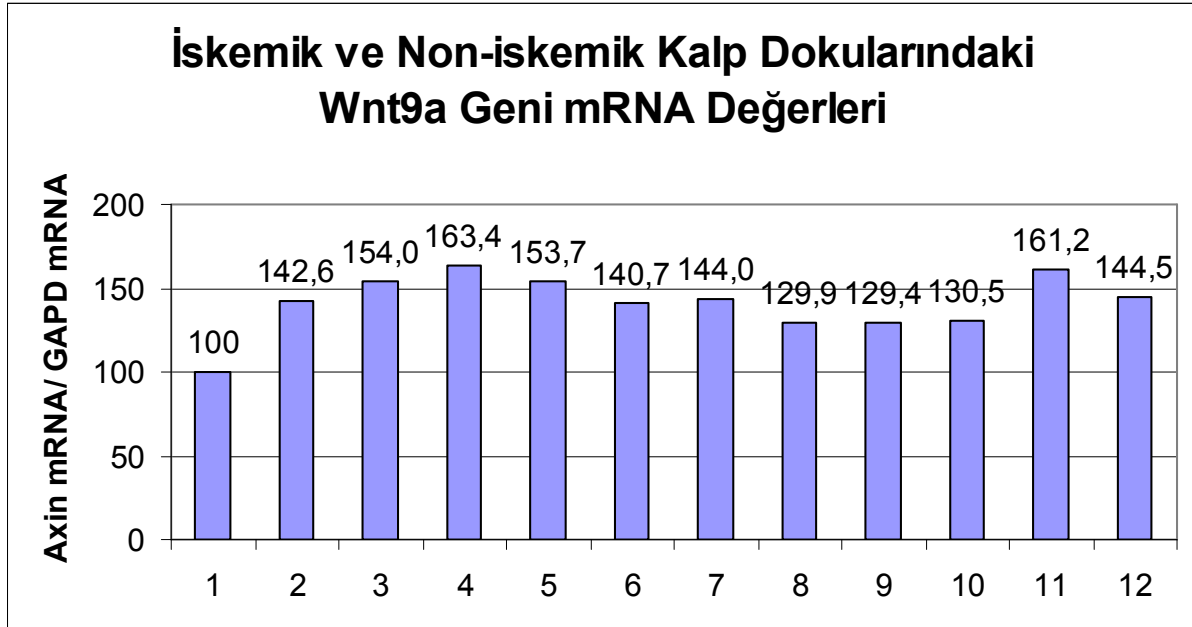
İskemik dokulardaki Fzd2 geni mRNA değerleri ortalaması 147, kontrol-iskemik dokuların ortalaması ise 171'dir. Deneysel bir hatadan dolayı 4. örnekte amplifikasyona rastlanmamış ve değerlendirmeden çıkarılmıştır. Buna göre, Fzd2 gen ekspresyonunda sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan miyokardiyal enfarktüse bağlı olarak azalma olmuştur.

Wnt9a:

Wnt9a geni mRNA'sına özgül primerler ile cDNA üzerinden hedef bölgenin kopya sayısı, PCR ürünlerine ait bantların densitometrik olarak ölçülmesi ile değerlendirildi. PCR ürünlerinin agaroz jelindeki görüntüleri (Şekil 29) ve densitometrik ölçüm sonuçları (Şekil 30) aşağıda gösterilmektedir.



Şekil 29: Deney ve kontrol gruplarında Wnt9a gen ürünleri.



Şekil 30: Deney ve kontrol gruplarında Wnt9a gen ürünlerinin densitometrik analizi.

İskemik dokulardaki Wnt9a geni mRNA değerleri ortalaması 143, kontrol-iskemik dokuların ortalaması ise 140'dur. Buna göre Wnt9a gen ekspresyonunda sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan miyokardial enfarktüs sonucunda bu koşullarda değişime rastlanmamıştır.

7. TARTIŞMA:

Koroner arterlerde aterosklerozun neden olduğu stenoz miyokardın yeterli oksijen desteğini alamamasına, bu nedenle akut miyokard enfarktüsü (MI) gelişimine yol açar. Tıkanıklık devam ettiği sürece miyokardiyal hasar alanındaki hücrelerde geri dönüşümsüz hasar ve bunu takiben doku nekrozu gelişir. Hücre düzeyinde algılanan hipoksiye yanıt olarak miyokardiyal hücrelerin korunmalarını ve canlı kalmaya devam edebilmelerini sağlayacak protein yapı ve gen ekspresyonu değişiklikleri meydana gelmektedir. Hipoksinin algılanmasını takiben, tıkanan damarın beslediği miyokard sahasına kan akımının idamesini gerçekleştirebilecek yeni mekanizmaların aktive olduğu da bilinmektedir.^{4,5}

Son yıllarda özellikle kalp krizi sonrası hasarlanmış bölgenin tedavisinde yetişkin kalp kök hücre nakli ve gen tedavisi, kalp hastalıklarında umut vaadeden yeni bir tedavi biçimidir. Kök hücre tedavisinde kullanılan progenitör hücreler erken fetal dönemdeki farklılaşmayı taklit ederek hasara uğramış bölgede yeni hücrelerin oluşturulmasını sağlayan önemli bir tedavi stratejisi olmuştur.

İskemik kalp hastalıklarında özellikle miyokard enfarktüsü sonrasında enfarkt alanında kan dolaşımının yeniden sağlanabilmesi için anjiyogenez önemli bir süreçtir. Gen tedavisi gibi yeni geliştirilen tedavi yöntemleri ile anjiyogenezin indüklenip iskemik alanın sınırlanması amaçlanmaktadır. Tüm bu ve benzeri yeni tedavilerin geliştirilmesi için miyokardial enfarktüs sonrası hücre sağkalımı, proliferasyonu, göçü, hücre dışı matriks değişimleri ve anjiogenez ile ilgili sinyal yollarındaki moleküler değişimlerin aydınlatılması çok önemlidir.

La Framboise ve arkadaşları, 2005 yılında yaptıkları çalışmada ratlarda deneysel olarak oluşturulan MI sonrası kısa ve uzun vadede (1 ve 28 gün), infarkt ve remote zondaki gelişen tüm genom değişikliklerine mikroarray yöntemi ile bakmışlar. Buna göre en erken yanıt olarak test edilen birinci günde infarkt alanında inflamasyon genlerinden, interlökinler (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12 α , IL-18) ve TNF- α dışında çok ciddi değişimlerin görülmediğini; 28. günde infarkt alanındaki değişimlerin, birinci günde remote zonda gözlenen değişimler ile aynı olduğunu

saptamışlar. Bunlar, matriksin yeniden modellenmesi ve histogenez programının başlatılması için gereken hücre proliferasyonu ile ilgili bazı genlerdeki (MMP 9, 12, 23, MYC, EGR2, ATF3, HOXA1) değişimlerdir. Bu çalışma MI sonrasında oluşan hasarın uzun sürede nasıl kompanse edildiğini anlamak adına önemlidir. Fakat yine bu çalışmadan anlaşılan, MI sırasında ya da hemen sonrasında gelişen kısa yanıtta, iskemi geçiren infarkt alan hücrelerindeki değişimden çok remote zone ve/veya non-iskemik alandaki değişimler akut MI yanıtlarında daha önemlidir. Buna göre biz çalışmamızda ratlarda LAD'yi bağlamak suretiyle oluşturduğumuz miyokard iskemi modelinde, MI sonrasındaki ilk 30 dakikada yani hücreler nekroza girmeden, sadece iskemik ve non-iskemik alanlardaki hızlı hücresel yanıtlara bakmayı amaçladık. Bu konuda hücrenin yeniden yapılanması ve anjiyogenez sürecinde etkili olduğu yeni tanımlanan ve üzerinde çalışmalara yeni başlanmış olan Wnt-frizzled sinyal ileti yolağını seçtik.

Bu tez çalışmasının devamında sözü geçen modelde mikroarray yöntemi ile tüm gen değişimlerine transkript (RNA) düzeyinde bakılması planlanmaktadır. Burada sadece hücre çoğalması, farklılaşması, anjiyogenez gibi birçok mekanizmada önemli rolü olduğu bilinen Wnt- frizzled sinyal yolağındaki bazı genlerin yine transkript düzeyindeki değişimlerine RT-PCR yöntemi ile bakıldı.

Wnt-frizzled yolağının yeniden yapılanma ve anjiyogenez sürecinde oynadığı rol konusunda yapılan çalışmalar büyük oranda embriyonel dönemdeki farklılaşma süreçlerine etkisi üzerine yoğunlaşmaktadır. Oysa biz çalışmamızda miyokard iskemi modeli yaratıp iskemik ve non-iskemik alanda bu yolağın nasıl etkilendiğini araştırdık ve kendimize bu yolak üzerinde hedef genler belirleyerek, bu genlerde transkripsiyon düzeyinde gerçekleşen değişimleri gözlemlemeyi ve gelecekte MI sonrası geliştirilebilecek olası tedavi stratejileri için aday molekülleri tanımlamayı amaçladık.

RT-PCR yöntemi ile Wnt/ β -katenin sinyal yolağını aktive eden Wnt proteinleri arasından Wnt9a'nın, membranda yerleşik reseptör proteinlerden Frizzled-2'nin, Wnt yada frizzled proteinlerine bağlanarak antagonistik etki yapabilen sFRP1'in, sinyal iletiminin aktive olmasıyla ekspresyonu düzenlenen Axin proteininin ve sinyal yolağının son aşamasında uyarılan TCF4 transkripsiyon faktörünün ekspresyon düzeylerini değerlendirdik.

Barandon ve arkadaşları miyokardiyal iskemi sonrasında, sinyal oluşturucu protein olan wnt'e bağlanarak reseptörün aktive olmasını engelleyen FrzA/sFRP1 proteinini iskemik alanda değerlendirdikleri çalışmada, bu protein ekspresyonunun iskemik alanda arttığını

saptamışlardır. FrzA proteini ekspresyonu artışının iskemik alanda klasik Wnt/ β -katenin yolağı aktivasyonunu engelleyip GSK-3 β sinyal ileti yolağını aktive ettiğini tespit etmişler.^{2,77} Oysa biz çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre, FrzA proteininin non-iskemik dokuda daha yüksek düzeyde eksprese edildiğini saptadık. Biz de FrzA proteini ekspresyon artışının, non-iskemik alanda klasik Wnt/ β -katenin yolağı aktivasyonunu engellediğini ve olasılıkla diğer sinyal ileti molekülleri aracılığıyla hücre canlılığını ve kardiyomiyosit fonksiyonlarını düzenlediğini düşünmekteyiz.

İskemik miyokardiyal hasar oluşumu sonrasında iskemik ve non-iskemik alanlar arasında gen ekspresyonu değişimlerini inceleyen bir çalışmada da iskemik alanda wnt yolağı tarafından regüle edilen β -katenin proteini ekspresyonunun belirgin miktarda azaldığı gösterilmiştir. β -katenin ile birlikte rol alan TCF4 transkripsiyon faktörü düzeyinde ise hem iskemik hem non-iskemik alanda azalma saptanmıştır.⁷⁸ Bizim çalışmamız sonucunda da benzer şekilde TCF4 gen ekspresyonunda iskemik ve non-iskemik alanlar arasında fark saptanmamıştır. Ancak eldeki veriler TCF4'ün aktivasyon düzeyi değişimi ile ilgili bilgi vermemektedir.

Vektör aracılığıyla FrzA proteini ekspresyonu arttırılmış farelerde Barandon ve arkadaşlarının yaptıkları diğer bir çalışmada ise; iskemik alanın küçüldüğünü, ölü hücre oranının azaldığını ve kalp fonksiyonlarının kontrollere göre belirgin miktarda korunduğunu gözlemlemişlerdir.⁷⁷ Bu farelerde La Framboise ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadaki bulgulara benzer olarak matriks yıkımına neden olan MMP-9 protein miktarında da azalma saptamışlar.⁵¹ Bu azalmanın esas olarak granülosit infiltrasyonunda azalma ile ilişkili olduğu ve beraberinde kardiyak rüptürde⁷⁹ ve enfarktli duvarda incelmeyi azalttığı düşünülmektedir.⁸⁰ Biz çalışmamızda MMP-9'u değerlendirmedik.

Erişkinlerde kardiyak hipertrofi ve iskemik hasar yanıtı konusunda yapılan çalışmalar giderek artmaktadır. Kardiyak hipertrofi gelişiminde Wnt-frizzled yolağı proteinlerinin ekspresyon düzeylerinde değişimler saptanmıştır. Boheler ve arkadaşları sıçanlarda yaptıkları çalışmalarda, hipertrofik kalp dokusunda hücre membranında yerleşik frizzled-2 reseptör proteini ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Bu artışın sinyal yolağını aktive ettiği ve hücre içi β -katenin miktarını arttırdığı belirlenmiştir.^{61,62} Wnt-frizzled yolağı reseptörü olan frizzled-2 ekspresyonu iskemik koşullarda da değişim göstermektedir. Miyokardiyal iskemi sonrasında frizzled-2 reseptör protein miktarının arttığı saptanmıştır.⁷⁷ Frizzled-2 artışının, miyofibroblastların enfarkt alanına migrasyonunu arttırdığı öne sürülmektedir. Yaptığımız

ekspresyon analizi çalışmaları sonucunda, biz Frizzled-2'nin non-iskemik dokuda arttığını belirledik.

Özetle yaptığımız çalışmada, FrzA analogu sFRP-1 ve Frizzled-2 proteinlerinin non-iskemik alandan alınan miyokard örneklerinde iskemik alandan alınan miyokard örneklerine kıyasla daha yüksek oranda bulunduğu saptanmıştır. Wnt-frizzled yolağını uyaran wnt9a proteini ekspresyonu açısından iki grup arasında değişim gözlenmemiştir. Benzer şekilde Wnt-frizzled sinyal yolağı tarafından ekspresyonu düzenlenen Axin geni ekspresyonu düzeyi de farklılık göstermemiştir. Kıyaslamalı olarak Axin ve Wnt proteinlerine ait literatürde yeterli bilgiye rastlamadık. Bu veriler non-iskemik dokuda Wnt-frizzled yolağı proteinlerinin, klasik Wnt/ β -katenin sinyalinin baskılanması yönünde değişime uğradığını göstermektedir. Wnt-frizzled sinyallerinin hangi genler üzerinden hücre canlılığını ve endotel migrasyonunu düzenlediği gelecekteki çalışmalar açısından önemli araştırma konuları olacaktır.

Wnt-frizzled sistemi hasarlı miyokardın bütünlüğünün korunmasını ve yeniden yapılanma sonrasında fonksiyonel olmasını sağlamaktadır. Wnt ve frizzled genlerinin iskemik ve non-iskemik miyokard dokularında nasıl regüle edildiği, hipoksik stres altındaki miyokardiyal sağkalım ve iskemik miyokarda kan akımının yeniden sağlanması süreçlerinde nasıl bir rol oynadığı tam olarak belirlenememiştir. Biz iskemik miyokard hücrelerinin sağ tutulmasında ve iskemik miyokardiyuma kan akımının idamesinde Wnt-frizzled sistemi etkilerinin belirlenmesinin, MI geçirmekte olan hastalara tedavi yaklaşımını daha duyarlı ve seçici hale getireceğini düşünmekteyiz.

8. KAYNAKLAR:

1. Chen L, Wu Q, Guo F, Xia B, Zuo J. Expression of Dishevelled-1 in wound healing after acute myocardial infarction: possible involvement in myofibroblast proliferation and migration. *J Cell Mol Med.* 2004 Apr-Jun;8(2):257-64.
2. Barandon L, Couffinhal T, Ezan J, Dufourcq P, Costet P, Alzieu P, Leroux L, Moreau C, Dare D, Duplaa C. Reduction of infarct size and prevention of cardiac rupture in transgenic mice overexpressing FrzA. *Circulation.* 2003 Nov 4;108(18):2282-9. Epub 2003 Oct 27.

3. van Gijn ME, Daemen MJ, Smits JF, Blankesteyn WM. The wnt-frizzled cascade in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2002 Jul;55(1):16-24. Review. No abstract available.
4. Oliver Distler, Michel Neidhart, Renate E. Gay, and Steffen Gay; The moleküler control of angiogenesis. WHO Collaborating Center for Molecular Biology and Novel Therapeutic Strategies for Rheumatic Diseases, University Hospital Zurich, Zurich Switzerland. *Intern. Rew. Immunol*, 21:33-49,2002.
5. Yasufumi Sato. Molecular mechanism of angiogenesis Transcription factor and their therapeutic relevance, *Pharmacology and Therapeutics* 87 (2000) 51-60.
6. van Gijn ME, Blankesteyn WM, Smits JF, Hierck B, Gittenberger-de Groot AC. Frizzled 2 is transiently expressed in neural crest-containing areas during development of the heart and great arteries in the mouse. *Anat Embryol (Berl)*. 2001 Mar;2003(3):185-92.
7. Cleutjens JP, Blankesteyn WM, Daemen MJ, Smits JF. The infarcted myocardium: simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovasc Res.* 1999 Nov;44(2):232-41.
8. Mesut R. Duran E. Kalp ve Damar Cerrahisi. Cilt 1. Kardiyovasküler Anatomi. Edirne: Çapa, 2004:37-54.
9. Solak H, Görmüş N. Paç M, Akçevin A, Aka S, Büket S, Sarioğlu T. Kalp ve Damar Cerrahisi Bölüm 1. Ankara: MN Medikal & Nobel, 2004:1-19.
10. Solak H, Görmüş N. Ekstrakorporeal Dolaşım. Bölüm 1. Nobel, 2005:1-15.
11. Solak H. Koroner Arter Cerrahisi. Konya:Gökçe ofset, 1995.
12. Cecil Essentials of Medicine. Üçüncü baskı 1995;63-80.
13. Gök H. Klinik Kardiyoloji. İkinci baskı 2002;195-213.
14. Robbins KC. Temel Patoloji. 1995;308-313.
15. Konukoğlu D, Turhan S.M. Molecular basis of angiogenesis mechanisms and tumor angiogenesis. *Cerrahpaşa J Med* 2005; 36: 42-48.
16. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003; 9: 653- 660.
17. Issa R, Krupinski J, Bujny T, Kumar S, Kaluza J, Kumar P. Vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, in human brain tissue after ischemic stroke. *Lab Invest.* 1999; 9: 417-425.

18. Yin G, Liu W, An P, Li P, Ding I, Planelles V, Schwarz EM, Min W. Endostatin gene transfer inhibits joint angiogenesis and pannus formation in inflammatory arthritis. *Mol Ther.* 2002; 5: 547- 554.
19. Lawrence WT, Diegelmann RF. Growth factors in wound healing. *Clin Dermatol.* 1994; 12: 157- 169.
20. Goodsell DS. The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem Cells.* 2003; 21: 118–119.
21. Brooks PC. Role of integrins in angiogenesis. *Eur J Cancer.* 1996; 32A: 2423–2429.
22. Hu DE, Hori Y, Fan TP. Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats. *Inflammation.* 1993; 17: 135- 143.
23. Cleaver O, Melton DA. Endothelial signalling during development. *Nat Med.* 2003; 9: 661- 668.
24. Allure R. Basement membranes: Structure, assembly and role in tumor angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 422- 433.
25. Haroon ZA, Peters KG, Greenberg CS, Dewhirst MW. Angiogenesis and Oxygen Transport in Solid Tumors. In: Totowa, New Jersey, Teicher BA (eds). *Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy.* 3- 21, Humana Press, 1999.
26. Mignatti P, Rifkin DB. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein.* 1996; 49: 117- 137.
27. Ausprunk DH and Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res.* 1977; 14: 53–65.
28. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: *Int J Cancer.* 1997; 72: 1-22.
29. Blasi F. uPA, uPAR, PAI- 1: Key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunol Today.* 1997; 18: 415- 417.
30. Stepanova VV, Tkachuk VA. Urokinase as a multidomain protein and polyfunctional cell regulator. *Biochemistry (Mosc).* 2002; 67: 109- 118.
31. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9: 669- 676.

32. Pepper MS, Montesano R, Mandriota SJ, Orci L, Vassalli JD. Angiogenesis: A paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein.* 1996; 49: 138–162.
33. Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, Keshet E. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci.* 1995; 15: 4738- 4747.
34. Zachary I, Mathur A, Yla-Herttuala S, Martin J. Vascular protection: A novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1512- 1520.
35. Servos S, Zachary I, Martin JF. VEGF modulates NO production: The basis of a cytoprotective effect? *Cardiovasc Res.* 1999; 41: 509-510.
36. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor- 1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 181: 902- 906.
37. Turhan MS. Meme tümörlü hastalarda vasküler endotelial büyüme faktörü, nitrik oksit ve ürokinaz plazminojen aktivator. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıpta Uzmanlık tezi, 2004.
38. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 59: 21- 6.
39. Steiling H, Werner S. Fibroblast growth factors: Key players in epithelial morphogenesis, repair and cytoprotection. *Curr Opin Biotechnol.* 2003; 14: 533- 537.
40. Betsholtz C. Biology of platelet-derived growth factors in development. *Birth Defects Res Part C Embryo Today.* 2003; 69: 272- 285.
41. Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther.* 2003; 98: 257- 265.
42. Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *J Nucl Med.* 2003; 47: 149- 161.
43. Huelsken, J., and J. Behrens. The Wnt signaling pathways. *J Cell Sci* 2002; 115:3977-78.
44. Olson EN, Schneider MD. Sizing up the heart: development redux in disease. *Genes Dev* 2003; 15:1937-56.

45. M. Ikeya, S.M.K. Lee, J.E. Johnson, A.P. McMahon, S. Takada. Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* 1997; 389:966–70.
46. M. Park, X. Wu, K. Golden, D. Axelrod. The wingless signalling pathway is directly involved in *Drosophila* heart development. *Dev Biol* 1996; 177:104-16.
47. M. Kuhl, L.C. Sheldahl, M. Park, J.R. Miller and R.T. Moon. The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 2000; 16:279-83.
48. Nakamura T, Sano M, Songyang Z, Schneider MD. A Wnt- and beta -catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 13:5834-9.
49. M.E. van Gijn, F. Snel, J.P.M. Cleutjens, J.F.M. Smits and W.M. Blankesteyn. Over-expression of components of the Frizzled–Dishevelled cascade results in apoptotic cell death, mediated by β -catenin. *Exp Cell Res* 2001; 265:46-53.
50. Wang X, Xiao Y, Mou Y, Zhao Y, Hall JL. A role for the beta-catenin/T-cell factor signaling cascade in vascular remodeling. *Circ Res.* 2002 Feb 22;90:340-7.
51. Laframboise WA, Bombach KL, Dhir RJ, Muha N, Cullen RF, Pogoselski AR, Turk D, George JD, Guthrie RD, Magovern JA. Molecular dynamics of the compensatory response to myocardial infarct. *J Mol Cell Cardiol* 2005 Jan; 38:103-17.
52. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV ve Kaykas A. Wnt and β -catenin signalling: Diseases and Therapies. *Nature Reviews Genetics* 2004; 5:689- 98.
53. E. Lutgens, P. Leenders and J.F.M. Smits. Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Cardiovasc Res* 1999; 41:586-93.
54. M.C. Kuizinga, J.F.M. Smits, J.W. Arends and M.J.A.P. Daemen. AT2 receptor blockade reduces cardiac interstitial cell DNA synthesis and cardiac function after rat myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30:425-34.
55. G. Gabbiani. Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept. *Cardiovasc Res* 1998; 38:545-48.
56. W.M. Blankesteyn, Y.P.G. Essers-Janssen, M.J.A. Verluyten. Daemen and J.F.M. Smits. A homologue of *Drosophila* tissue polarity gene frizzled is expressed in migrating myofibroblasts in the infarcted rat heart. *Nature Med* 1997; 3:541–44.

57. M.E. van Gijn, R.E. Pratt. Alterations in the cadherin–catenin complex of dishevelled-1 knockout mice lead to infarct rupture after myocardial infarction. *Circulation* 1999; 100:56.
58. I.E.M.G. Willems, M.G. Havenith, and M.J.A.P. Daemen. The α -smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am J Pathol* 1994; 145:868-75.
59. M.J. Marvin, G. Di Rocco, S.M. Bush and A.B. Lassar. Inhibition of wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev* 2001; 15: 316–17.
60. Pandur P, Lasche M, Eisenberg LM, Kuhl M. Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature* 2002; 8:636-41.
61. K.R. Boheler and K. Schwartz. Gene expression in cardiac hypertrophy. *Trends Cardiovasc Med* 1992; 2:176-182.
62. S. Haq, G. Choukroun, Z.B. Kang et al. Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol* 2000; 151:117-129.
63. F. Fagotto, N. Funayama, U. Gluck. Binding to cadherins antagonizes the signaling activity of beta-catenin during axis formation in *Xenopus*. *J Cell Biol* 1996; 132:1105-14.
64. H. Schumann, J. Holtz, H.R. Zerkowski and M. Hatzfeld. Expression of secreted frizzled related proteins 3 and 4 in human ventricular myocardium correlates with apoptosis related gene expression. *Cardiovasc Res* 2000; 45:720-28
65. W.M. Blankesteyn, M.E. van Gijn, Y.P.G. Essers-Janssen. Daemen and J.F.M. Smits. Beta-catenin, an inducer of uncontrolled cell proliferation and migration in malignancies, is localized in the cytoplasm of vascular endothelial cells during neovascularization after myocardial infarction. *Am J Pathol* 2000; 157:877-83.
66. P. Carmeliet and D. Collen. Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. *Ann NY Acad Sci* 2000; 902:249-62.
67. A.W. Cohen, J.M. Carbajal and R.C. Schaeffer. VEGF stimulates tyrosine phosphorylation of beta-catenin and small-pore endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol* 1999; 277:2038–49.
68. T. Nakamura, M. Sano, Z. Songyong. A wnt and β -catenin dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100:5834-39.

69. S. Noria, D.B. Cowan, A.I. Gotlieb and B.L. Langille. Transient and steady-state effects of shear stress on endothelial cell adherens junctions. *Circ Res* 1999; 85:504–14.
70. J.H. Tinsley, M.H. Wu, W. Ma, A.C. Taulman and S.Y. Yuan. Activated neutrophils induce hyperpermeability and phosphorylation of adherens junction proteins in coronary venular endothelial cells. *J Biol Chem* 1999; 274:24930-34.
71. C. Mao, O. Malek, M. Pueyo, G. Steg and F. Soubrier. Differential expression of rat frizzled-related frzb-1 and frizzled receptor fz1 and fz2 genes in the rat aorta after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:43-51.
72. C. Duplaa, B. Jaspard, C. Moreau and P.A. D'Amore. Identification and cloning of a secreted protein related to the cystein-rich domain of frizzled: Evidence for a role in endothelial cell growth control. *Circ Res* 1999; 84:1433-45.
73. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 14:12313-8.
74. Foley A, Mercola M. Heart induction: embryology to cardiomyocyte regeneration. *Trends Cardiovasc Med*. 2004 Apr; 14:121-5.
75. M.E. van Gijn, W.M. Blankesteyn, J.F.M. Smits, B. Hierck. Frizzled 2 is transiently expressed in neural crest containing areas during development of the heart and great arteries in the mouse. *Anat Embryol* 2001; 203:185-92.
76. Jonathan H, Edward M.B, Joanne L, Inhibition of the tissue factor-thrombin pathway limits infarct after myocardial ischemia-reperfusion injury by reducing inflammation. *American J.Pathol*;2000;157;6;1849-62.
77. Barandon L, Couffinhal T, Dufourcq P, et al. Frizzled A, a novel angiogenic factor: promises for cardiac repair. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 2004; 25:76-83.
78. Goodwin A.M, D'Amore P.A. Wnt signaling in the vasculature. *Angiogenesis* 2002; 5: 1–9.
79. Heymans S, Lutun A, Nuyens D, et al. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med*. 1999;5:1135–1142.

80. Lindsey ML, Gannon J, Aikawa M, et al. Selective matrix metalloproteinase inhibition reduces left ventricular remodeling but does not inhibit angiogenesis after myocardial infarction. *Circulation*. 2002;105:753–758.