



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**KONJENİTAL ARİTMİ PATOGENEZİNDE
KARDİYOMİYOSİT VE MAKROFAJ ETKİLEŞİMİNİN
İN VİTRO VE *İN VİVO* MODELLERDE ARAŞTIRILMASI**

ARZUHAN BÜYÜKER

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. ESRA ÇAĞAVİ

İSTANBUL, 2022

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji
Tez Sahibi : Arzuhan BÜYÜKER
Tez Başlığı : Konjenital Aritmi Patogeneğinde Kardiyomiyosit ve Makrofaj
Etkileşiminin In Vitro ve In Vivo Modellerde Araştırılması
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kuzey Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 22.07.2022

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Kurumu

İmza

Doç.Dr. Esra ÇAĞAVİ

İstanbul Medipol Üniversitesi

Sınav Jüri Üyeleri

Dr.Öğr.Üyesi Deniz DURALI

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof.Dr. Celal AKDENİZ

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof.Dr. Ahmet Zeki ŞENGİL

Ankara Medipol Üniversitesi

Prof.Dr. Akif TURNA

İstanbul Ün.-Cerrahpaşa

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun
...../...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil
yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Vekili

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Arzuhan BÜYÜKER

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgisinden ve tecrübesinden daima yararlandığım, karşılaştığım tüm zorluklara karşı beni cesaretlendiren, her daim pozitif düşünmem gerektiğini öğreten değerli danışmanım Doç. Dr. Esra Çağavi'ye,

Tez izleme komitelerimde bulunan ve her daim ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli tez jüri üyeleri Prof. Dr. Ahmet Zeki Şengil, Dr. Öğretim Üyesi Deniz Duralı, Prof. Dr. Celal Akdeniz, Prof. Dr. Akif Turna, Prof. Dr. Gürkan Öztürk ve Prof. Dr. Esin Aktaş Çetin'e,

Tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Aylin Nebol, Oğuzhan Köse, İlham Bahar, Emre Vatandaşlar, İlayda Aydın, Tuba Akgül Çağlar, Sevilay Şahoğlu Göktaş, Gizem Örs, Zeynep Begüm Durdu, Mehmet Uğurcan Turhan, Gizem Yörükoğlu, Özlem Burnaz, Behnaz Karadoğan'a,

Optimizasyon deneyleri için kullanılan hücre hattı ve malzeme desteği için Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü öğretim görevlisi Prof. Dr. Nesrin Özören'e ve Doç. Dr. Umut Şahin'e,

Elektron mikroskopi çalışmalarında destek veren Sadık Bay ve Mehmet Şerif Aydın'ya,

Destekleri ve yardımları için bütün SABİTA idari ve akademik personeline,

Desteklerini esirgemeyen tüm MEDİTAM idari personeli ve çalışanlarına,

Desteğini her an hissettiğim, her zaman yanımda olan ve beni motive eden hayat arkadaşım Can Büyüker'e,

Akademik hayatımda her zaman destek olarak maddi manevi desteğini esirgemeyen annem ve babama,

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	8
4.1 Kalp Gelişimi, Anatomisi ve Fizyolojisi.....	8
4.2 Kalpte Elektriksel İleti Sistemi	12
4.2.1 Kalpte aksiyon potansiyeli	13
4.2.2 Elektrokardiyografi	16
4.2.3 Kardiyovasküler sistemde oluklu bağlantılar.....	18
4.3 Konjenital Aritmiler	19
4.3.1 SCN5A geni	20
4.3.2 SNC5A gen mutasyonları ilişkili ventriküler aritmiler.....	22
4.3.3 CASQ2 geni.....	23
4.3.4 CASQ2 gen mutasyonları ilişkili ventriküler taşikardiler	24
4.4 Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (uPKH) Üretilmesi ve Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması	25
4.5 Kardiyomiyositlerde Fonksiyonel Karakterizasyonlar	27
4.5.1 Hücre içi Ca ⁺² görüntüleme	27
4.5.2 Video temelli kasılma analizi MUSCLEMOTION	28

4.6	Kardiyak aritmi immünopatogenezi.....	28
4.7	İmmün Sistem ve Hücreleri	29
4.7.1	Makrofajlar.....	31
4.7.2	Makrofajların gelişimsel süreci.....	33
4.7.3	Makrofajların görevleri	34
4.7.4	Makrofaj alt tipleri	36
4.7.5	<i>İn vitro</i> makrofaj farklılaşması.....	41
4.8	Kardiyak Makrofajlar.....	42
4.9	Literatürde Kardiyomiyosit ve Makrofaj Etkileşimini İnceleyen <i>İn Vitro</i> Kokültür Çalışmaları.....	45
5.	MATERYAL VE METOD.....	47
5.1	Kullanılan Teknik Cihazlar ve Sarf Malzemeler	48
5.2	<i>Ex Vivo</i> Deneyler.....	56
5.2.1	Genotip analizi	56
5.2.2	Elektrokardiyografi (EKG) kaydı alınması.....	57
5.2.3	Doku alımı, saklanması ve kesit alınması	58
5.2.4	Kalp kesitlerinde mason trikrom boyama	59
5.2.5	Kalp kesitlerinde immünfloresans boyamalar.....	60
5.3	<i>İn Vitro</i> Deneyler.....	60
5.3.1	PBMC izolasyonu	61
5.3.2	PMBC'lerin yeniden programlanmasıyla uPKH üretilmesi	62
5.3.3	UPKH kültüründen kardiyomiyosit farklılaştırılması.....	63
5.3.4	Kardiyomiyositlerde yeniden ekim protokolleri	64
5.3.5	Hücre canlılık analizi	66
5.3.6	Kardiyomiyosit hücre skoru belirleme.....	66
5.3.7	THP-1 monosit hücre hattı kültürü ve makrofaj farklılaştırılması.....	67
5.3.8	PBMC hücrelerinden CD14 ⁺ monositlerin ayrıştırılması	68
5.3.9	CD14 ⁺ monositlerin makrofajlara farklılaştırılması.....	69
5.3.10	Makrofaj ve kardiyomiyosit kokültürlerinin oluşturulması	70
5.3.11	Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi.....	71

5.3.12	Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)	71
5.3.13	Makrofajlarda fagositoz analizi	72
5.3.14	Canlı lizozom boyaması	73
5.3.15	Akım sitometrisi	73
5.3.16	Total RNA İzolasyonu	74
5.3.17	Komplementer DNA sentezi	75
5.3.18	Kantitatif tersine transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (Kantitatif RT-PZR)	75
5.3.19	İmmünohistokimyasal boyama	77
5.3.20	Hücre içi Ca^{+2} görüntüleme	77
5.3.21	Video tabanlı fonksiyonel kasılma analizi MUSCLEMOTION	78
5.3.22	Ritim Analizi	79
5.3.23	Hızlandırılmış çekim ile görüntüleme (Time-lapse)	79
5.4	İstatistiksel Analizler	79
6.	BULGULAR	81
6.1	<i>Ex Vivo</i> Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular	81
6.1.1	Vahşi tip ve transgenik farelerin çoğaltılması ve genotiplenmesi	82
6.1.2	Vahşi tip ve transgenik fare soylarında EKG ölçümleri	82
6.1.3	Fare kalp dokularında Mason Trikrom boyamalar	85
6.1.4	Atriyoventriküler nodun lokasyonunun aydınlık alan mikroskobu ile incelenmesi	87
6.1.5	Fare dalak dokusu immünfloresan boyamaları	88
6.1.6	Fare kalp dokusunda immünfloresans boyamalar	89
6.1.7	Fare kalp dokusunda AV nodun immünfloresans boyamaları ...	91
6.1.8	CX3CR1 ⁺ makrofajların morfolojik olarak incelenmesi	94
6.1.9	AV nod dışı bölgelerde kardiyak makrofajların incelenmesi	95
6.1.10	Fare kalp dokularında CX3CR1 ⁺ kardiyak makrofajların yoğunluk analizi	99
6.2	<i>In vitro</i> Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular	101
6.2.1	Sağlıklı ve hasta bireylerden kan örneklerinin toplanması	103

6.2.2	Uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) kültürü karakterizasyonu	105
6.2.3	Uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) kültürlerinden kardiyomiyosit farklılaştırması ve karakterizasyonu	107
6.2.4	Uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) kökenli kardiyomiyositlerin yeniden ekimi ve morfolojik gözlemleri	111
6.2.5	Yeniden ekimi yapılan kardiyomiyositlerin canlılık analizi	113
6.2.6	Yeniden ekimi yapılan kardiyomiyositlerde immünboyamalar ve hücre skoru belirleme	114
6.2.7	THP-1 monosit hücre hattı kökenli makrofaj kültürlerinde optimizasyonlar	118
6.2.8	Manyetik ayrıştırma yöntemiyle insan monositlerinin saflaştırılması ve karakterizasyonu	119
6.2.9	Makrofaj kültürü farklılaştırmasında besiyeri ve hücre sayısı optimizasyonları	121
6.2.10	Makrofaj kültürlerinde morfolojik incelemeler	122
6.2.11	Makrofaj kültürlerinde fagositoz analizi	126
6.2.12	Makrofaj kültürlerinde Fc reseptör bloklama	128
6.2.13	Makrofaj kültürlerinde akım sitometrisi analizi	129
6.2.14	Makrofaj kültürlerinde M1/M2 fenotipi polarizasyonu ve karakterizasyonu	131
6.2.15	Sağlıklı ve hasta kökenli makrofaj kültürlerinde moleküler karakterizasyonlar	132
6.2.16	Kokültürlerde hücre oranı ve süre optimizasyonu	137
6.2.17	Sağlıklı ve hasta kökenli kokültür gruplarının oluşturulması ve hücreler arası bağlantıların morfolojik olarak incelenmesi	138
6.2.18	Tekli ve kokültürlerde immünohistokimyasal incelemeler	142
6.2.19	Kokültürlerde kantitatif RT-PZR ile gen ifade analizleri	147
6.2.20	Tekli ve kokültürlerde hücre içi Ca^{+2} analizleri	148
6.2.21	Tekli kültürlerde ve kokültürlerde MUSCLEMOTION fonksiyonel kasılma analizleri	155
6.2.22	Tekli kültürlerde ve kokültürlerde ritim analizleri	160

7. TARTIŞMA	162
7.1 <i>Casq2</i> ^{-/-} Farelerin AV Nod Bölgelerinde CX3CR1 ⁺ Kardiyak Makrofaj Yoğunluğunun Azalması	162
7.2 Olgunlaşmamış ve Matür Kardiyomiyositlerin Yeniden Ekim Protokollerinin Tanımlanmasında Enzim ve Matriks Seçimi	167
7.3 Moleküler Açıdan Sağlıklı Birey Kökenli Makrofajların M2 Fenotipi, Hasta Birey Kökenli Monositlerin M1 Fenotipi Sergilemesi	168
7.4 Sağlıklı Makrofajların Aritmi Fenotipi Gösteren Hasta Kökenli Kardiyomiyositlerin Atım Frekansını Düşürmesi ve Ritmini Düzenlemesi	174
8. SONUÇ	179
9. KAYNAKLAR	181
10. ETİK KURUL ONAYI	210
11. ÖZGEÇMİŞ	215

KISALTMALAR LİSTESİ

AF	Atriyal fibrilasyon
APC	Allofikosiyinin
ARG	Arginin
AV nod	Atriyovenriküler nod
BPM	Dakikadaki atım sayısı (Beats per minute)
BSA	Sığır serum albumini
Ca²⁺	Kalsiyum iyonu
Casq2	Kalsekuestrin
CCL	CC Kemokin ligand
CCR	CC Kemokin Reseptör
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementer DNA
CPVT	Katekolaminerjik polimorfik ventriküler taşikardi
CSF1R	Koloni sitmüle edici factor 1 reseptörü
CTNT-CTNI	Kardiyak Troponin T & I
CX	Koneksin
CX3CR1	CX3C kemokin reseptör 1 (Fraktalin reseptör)
CXCL	CX kemokin ligand
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEL	Delesyon
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPBS	Dulbecco fosfat tampon salin çözeltisi
E	Embriyonik gün
EDTA	Etilenediaminetetraasetik asit
EKG	Elektrokardiyografi
FACS	Floresan aktivasyonlu hücre ayrıştırma
FBS	Fetal sığır serumu
FcyIII	Fc gama reseptörü III
FITC	Floresan izotiosiyanat
Fluo-4-AM	Yeşil floresan kalsiyum indükatörü (AM: Acetoxymethyl)
FPS	Saniye başına düşen kare sayısı (Frame per second)
GAPDH	Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
GFP	Yeşil floresan protein
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör

GSK-3	Glikojen sentaz kinaz 3
HCN4	Hiperpolarizasyon aktive siklik nükleotid kapılı potasyum kanalı 4
IAS	İnteratriyal septum
IFN-γ	Interferon gama
IgG	İmmunoglobulin G
IKr	Hızlı potasyum akımı
IKs	Yavaş potasyum akımı
IL	İnterlökin
iNOS	İndüklenebilir Nitrik oksit sentaz
IVS	İnter ventriküler septum
IWP-IWR	WNT yolağı inhibitörleri (Inhibitor of WNT pathway)
K⁺	Potasyum iyonu
kDa	kilodalton
KM	Kardiyomiyosit
LAMP	Lizozomal ilişkili membrane proteini 1
LPS	Lipopolisakkarit
M-CSF	Makrofaj koloni stimüle edici faktör
M0	Naiv makrofaj fenotipi
M1	Pro-inflamatuvar makrofaj fenotipi
M2	Anti-inflamatuvar makrofaj fenotipi
MACS	Manyetik active edici hücre ayrıştırma
MI	Miyokardiyal enfarktüs
MLC2A/V	Miyozin hafif zincir 2A atriyal/ventriküler form
MMR	Makrofaj mannoz reseptör
mV	Milivolt
MYH6	Miyozin ağır zincir 6/ α
MYH7	Miyozin ağır zincir 7/ β
MΦ	Makrofaj
Na⁺	Sodyum iyonu
Nav1.5	Voltaj kapılı sodyum kanalı alfa subuniti
NBCS	Yeni doğan buzağı serumu
ng	Nanogram
NK	Natural killer
P/S	Penisilin streptomisin
PBMC	Periferal kan mononükleer hücreleri

PBS	Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate buffered saline)
PFA	Paraformaldehit
PMA	Forbol-12-miristat-13-asetat
PPI	Kasılma tepeleri aralığı (Peak-to-peak interval)
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
QTc	Doğrulanmış QT aralığı (corrected QT)
RITC	Rodamin B izotiosiyanat
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PZR	Reverse (Tersine) transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu
RyR	Ryanodin reseptör
SA	Sinoatriyal
SCN5A	Sodyum voltaj kapılı kanalı alfa subuniti 5
Sn	Saniye
SR	Sarkoplazmik retikulum
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
TGF-β	Transforme büyüme faktörü- β
TLR	Toll benzeri reseptör
TNF-α	Tümör nekroz faktörü alfa
UPKH	Uyarılmış pluripotent kök hücre
UQTS	Uzun QT sendromu
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
WGA	Wheat germ agglutinin – Buğday germ aglutinini
μl	Mikrolitre

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 5.1 Teknik Cihazlar, Yazılımlar ve Markaları	48
Tablo 5.2 Hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler	49
Tablo 5.3 Hücre kültüründe kullanılan besiyeri içerikleri.....	51
Tablo 5.4 Moleküler tekniklerde kullanılan sarf malzemeler	53
Tablo 5.5 İmmün boyamalarda kullanılan sarf malzemeler.....	54
Tablo 5.6 İmmün boyamalarda kullanılan solüsyon içerikleri.....	54
Tablo 5.7 İmmünokimyasal boyamalarda kullanılan birincil ve ikincil antikorlar ...	55
Tablo 5.8 <i>Ex vivo</i> deneylerde kullanılan sedatifler	56
Tablo 5.9 Fare genotiplemesinde PZR'da kullanılan malzemeler	57
Tablo 5.10 Genotiplerede kullanılan PZR protokolü	57
Tablo 5.11 Genotiplerede kullanılan PZR primerleri	57
Tablo 5.12 Yeniden programlamada kullanılan Sendai virüsü enfeksiyon koşulları	62
Tablo 5.13 Komplementer DNA sentezi reaksiyon bileşenleri.....	75
Tablo 5.14 RT-PZR'de kullanılan primer dizileri.....	76
Tablo 5.15 Kantitatif RT-PZR reaksiyonu bileşenleri	76
Tablo 6.1 Vahşi tip ve <i>Casq2^{-/-}</i> farelerine ait EKG parametreleri.....	84
Tablo 6.2 Tez çalışması kapsamında kullanılan hücrelerin demografik tablosu.....	103
Tablo 6.3 Hasta grubu EKG verileri.....	104
Tablo 6.4 Yeniden ekimi yapılan erken gün kardiyomiyosit gruplarında sayılan hücre sayıları ve KM skorları.....	114
Tablo 6.5 Yeniden ekimi yapılan geç gün kardiyomiyosit gruplarında sayılan hücre sayıları ve KM skorları.....	115
Tablo 6.6 Kokültür gruplarının BPM değerleri.....	157
Tablo 6.7 Kokültür alt gruplarının BPM değerleri.....	159

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1 İnsanda kalp gelişimi.....	9
Şekil 4.2 Kalbin anatomik yapısı.....	10
Şekil 4.3 Kardiyak gelişimin hücreleri ve gelişimde görevli transkripsiyon faktörlerini gösteren şema.	11
Şekil 4.4 Kalbin tabakaları ve kardiyomiyositlerin yapısı.....	12
Şekil 4.5 Kardiyak aksiyon potansiyeli fazları ve kasılmada görevli iyon kanalları..	14
Şekil 4.6 Elektriksel impulsun kalpte yayılışı..	16
Şekil 4.7 Standart EKG grafiği ve kalbin ileti sistemin EKG verisi ile eşleşimi. EKG dalga ve intervallerini gösteren grafik.....	17
Şekil 4.8 Normal sinüs ritmi ve aritmi çeşitlerini gösteren EKG verileri.....	20
Şekil 4.9 $Na_v1.5$ kardiyak sodyum kanal proteinin yapısının şematik gösterimi.	21
Şekil 4.10 Sarkoplazmik retikulum içerisinde yer alan kalsekuestrin proteini.....	24
Şekil 4.11 İnsan uPKH üretimi ve teknolojisi kullanım alanları.	27
Şekil 4.12 Doğal ve edinsel immün sistemi.....	30
Şekil 4.13 Hematopoietik kök hücrelerden immün sistem hücrelerinin farklılaşması.	31
Şekil 4.14 Dokuya yerleşik makrofajların farede gelişim sürecinde hematopoez dalgaları.....	34
Şekil 4.15 M1 ve M2 polarizasyonunda görevli sinyal yolları.....	38
Şekil 4.16 Çeşitli hastalıklarda M1/M2 makrofaj polariteleri ve görevleri.	40
Şekil 4.17 Kardiyak makrofajların immünoelektrofizyolojik regülasyonunu özetleyen şekil.	44
Şekil 5.1 Tez çalışmasının deney basamaklarının özeti.....	47
Şekil 5.2 Transgenik farelerden EKG kaydı alınması..	58

Şekil 5.3 Yeniden ekim sonrası kardiyomiyosit hücrelerinin örnek birleşim görüntüsü..	67
Şekil 6.1 Tez çalışmasının <i>ex vivo</i> deney dizaynının grafiksel özeti.	81
Şekil 6.2 Transgenik farelerin genotip analizi.	82
Şekil 6.3 Vahşi tip ve transgenik farelerin EKG verilerinin karşılaştırılması.	83
Şekil 6.4 Fare kalp kesitlerinde mason trikrom boyamalar.	86
Şekil 6.5 Fare kalp kesitlerinde AV nodun ışık mikroskobu ile belirlenmesi.	87
Şekil 6.6 Vahşi tip fare dalak kesitlerinde makrofajların immünboyaması.	88
Şekil 6.7 Fare dalak kesitlerinde M1 makrofaj fenotipi immünboyaması.	89
Şekil 6.8 Fare kalplerinde birlikte lokalize olan CX3CR1 ⁺ ve F4/80 ⁺ makrofajların immünboyama analizi.	90
Şekil 6.9 Vahşi tip fare AV nod bölgesinde bulunan CX3CR1 ⁺ kardiyak makrofajların immünboyaması.	92
Şekil 6.10 <i>Casq2</i> ^{-/-} fare kalp kesitlerinde AV nod bölgesi CX3CR1 ⁺ makrofajların immün boyaması.	93
Şekil 6.11 Sağlıklı fare kalbinde AV nod içi CX3CR1 ⁺ makrofaj morfolojisinin immünboyamalarla incelenmesi.	94
Şekil 6.12 AV nod dışı miyokardiyum doku içerisinde CX3CR1 ⁺ makrofaj morfolojisinin immünboyamalarla incelenmesi.	95
Şekil 6.13 Vahşi tip fare kalbinin ileti sistemi ve kalp tabakalarında CX3CR1 ⁺ kardiyak makrofajların immünboyaması.	96
Şekil 6.14 Vahşi tip fare kalbinin odacık ve kapakçıklarında CX3CR1 ⁺ kardiyak makrofajların immünboyaması.	97
Şekil 6.15 <i>Casq2</i> ^{-/-} fare kalbinin ileti sistemi ve kalp tabakalarında CX3CR1 ⁺ kardiyak makrofajların immünboyaması.	98
Şekil 6.16 <i>Casq2</i> ^{-/-} fare kalbinin odacık ve kapakçıklarında CX3CR1 ⁺ kardiyak makrofajların immünboyaması.	99

Şekil 6.17 CX3CR1 ⁺ makrofajların gözlenmeye başladığı ve sonlandığı AV nodu içeren interatriyal septum bölgelerini içeren kesitler.	100
Şekil 6.18 Vahşi tip ve <i>Casq2</i> ^{-/-} farelerin CX3CR1 ⁺ kardiyak makrofajlarının kantitatif analizi.	101
Şekil 6.19 Tez çalışmasının <i>in vitro</i> deney dizaynının grafiksel özeti.	102
Şekil 6.20 Hasta grubu EKG bulguları.	104
Şekil 6.21 Uyarılmış pluripotent kök hücre kültürlerinin ışık mikroskopi görüntüleri ve karyotip analizi.	105
Şekil 6.22 Uyarılmış pluripotent kök hücre kültürlerinin moleküler karakterizasyonu.	106
Şekil 6.23 UPKH kültürlerinden kardiyomiyosit farklılaştırması.	108
Şekil 6.24 Kardiyomiyosit kültürlerinde kantitatif RT-PZR ile mRNA ifade analizleri.	109
Şekil 6.25 Kardiyomiyosit kültürlerinde immünboyama ve akım sitometrisi.	110
Şekil 6.26 Yeniden ekimi yapılan kardiyomiyosit hücre gruplarında morfolojik analizleri.	112
Şekil 6.27 Yeniden ekimi yapılan kardiyomiyosit hücre gruplarının MTT canlılık analizi.	113
Şekil 6.28 Yeniden ekimi yapılan erken gün kardiyomiyosit hücre gruplarının analizi.	116
Şekil 6.29 Yeniden ekimi yapılan geç gün kardiyomiyosit hücre gruplarının analizi.	117
Şekil 6.30 THP-1 hücre hattından farklılaştırılan makrofajların karakterizasyonu.	119
Şekil 6.31 MACS yöntemiyle izole edilen monositlerin karakterizasyonu.	120
Şekil 6.32 Makrofaj farklılaştırması ve besiyeri optimizasyonu.	121
Şekil 6.33 Makrofaj farklılaştırmasında hücre sayısı optimizasyonu.	122

Şekil 6.34 Sağlıklı ve hasta kökenli makrofaj farklılaştırma kültürlerinin ışık mikroskobu görüntüleri.....	123
Şekil 6.35 Makrofaj kültürlerinde değişik morfolojideki hücrelerin incelenmesi...	124
Şekil 6.36 Taramalı elektron mikroskopi (SEM) ile makrofaj morfolojilerinin incelenmesi.....	125
Şekil 6.37 Geçirimli elektron mikroskopi (TEM) analizi ile sağlıklı makrofaj hücre içi organellerin incelenmesi..	126
Şekil 6.38 Makrofaj kültürlerinde fagositoz analizi..	127
Şekil 6.39 Makrofaj kültürlerinde Fc reseptör bloklama optimizasyonlu immünboyama görüntüleri.....	128
Şekil 6.40 Sağlıklı ve konjenital aritmi hasta kökenli makrofaj kültürlerinde akım sitometrisi analizi..	130
Şekil 6.41 Polarize edilen makrofajlarda kantitatif RT-PZR ve immünboyamalar.	132
Şekil 6.42 Sağlıklı ve konjenital aritmi hasta kökenli makrofajlarda mRNA ifadelerinin analizi.....	135
Şekil 6.43 Sağlıklı ve konjenital aritmi hasta kökenli makrofajlarda immünboyamalar..	136
Şekil 6.44 Kokültürlerde makrofaj ve kardiyomiyosit hücre oranları optimizasyonu..	138
Şekil 6.45 Kokültürlerin oluşturulması ve ışık mikroskobu görüntüleri.	140
Şekil 6.46 Kokültürlerde hızlandırılmış (time-lapse) çekimler.	140
Şekil 6.47 Sağlıklı kokültürlerde taramalı elektron mikroskopi görüntüleri.	141
Şekil 6.48 Tekli ve kokültürlerde membran temelli canlı boyamalar.....	142
Şekil 6.49 Kokültürlerde membran temelli immünohistokimyasal incelemeler..	143
Şekil 6.50 Kokültürlerde membran etkileşimlerinin detaylı immünohistokimyasal incelemeleri.....	144

Şekil 6.51 Sağlıklı ve konjenital aritmi hasta kökenli kardiyomiyosit tekli kültürlerinde CX43 immünboyamaları.....	145
Şekil 6.52 Kardiyak kültürlerde kardiyomiyosit ve kardiyomiyosit olmayan hücre arasında gözlenen CX43 immünboyaması.....	146
Şekil 6.53 Makrofaj tekli kültürlerinde CX43 immünboyaması.	146
Şekil 6.54 Kokültürlerde CX43 immünohistokimyasal incelemeler..	147
Şekil 6.55 Kokültürlerde kantitatif RT-PZR ile M1/M2 makrofaj fenotipleri gen ifade analizleri.....	148
Şekil 6.56 Sağlıklı tekli kardiyomiyosit kültürlerinde hücre içi Ca^{+2} değişim grafikleri.....	149
Şekil 6.57 Hasta kökenli tekli kardiyomiyosit kültürlerinde hücre içi Ca^{+2} değişim grafikleri.....	149
Şekil 6.58 Tekli kardiyomiyosit kültürlerinin karşılaştırmalı ortalama hücre içi Ca^{+2} değişimi grafiği..	150
Şekil 6.59 Tekli makrofaj kültürlerinin hücre içi Ca^{+2} görüntüleme analizleri..	150
Şekil 6.60 Grup 1 kokültürlerde hücre içi Ca^{+2} görüntüleme analizi grafikleri.....	151
Şekil 6.61 Grup 2 kokültürlerde hücre içi Ca^{+2} görüntüleme analizi grafikleri.....	152
Şekil 6.62 Grup 3 kokültürlerde hücre içi Ca^{+2} görüntüleme analizi grafikleri.....	152
Şekil 6.63 Grup 4 kokültürlerde hücre içi Ca^{+2} görüntüleme analizi grafikleri.....	153
Şekil 6.64 Kokültürlerde hücre içi Ca^{+2} görüntülemeleri.	154
Şekil 6.65 Kokültürlerde makrofajlar ile kardiyomiyositler arasında Ca^{+2} değişimlerinin korelasyon analiz grafiği.....	155
Şekil 6.66 Tekli kardiyomiyosit kültürlerinde MUSCLEMOTION fonksiyonel kasılma analizleri..	156
Şekil 6.67 Kokültür grupları arası BPM değerlerinin karşılaştırılması..	157
Şekil 6.68 Kokültür alt grupları arasında BPM değerlerinin karşılaştırılması.....	159
Şekil 6.69 Monokültür ve kokültürlerdeki kardiyomiyositlerin ritim analizleri.....	161

1. ÖZET

KONJENİTAL ARİTMİ PATOGENEZİNDE KARDİYOMİYOSİT VE MAKROFAJ ETKİLEŞİMİNİN *İN VİTRO* VE *İN VİVO* MODELLERDE ARAŞTIRILMASI

Dünyada büyük oranda morbidite ve mortalite sebebi olan konjenital aritmilerin patogeneğinde immün sistemin elektrofizyolojik rolleri henüz anlaşılamamıştır. Sağlıklı durumda kalbin atım profillerini düzenlediği keşfedilen kardiyak makrofajlar, konjenital aritmi insan ve fare modellerinde incelenmemiştir. Bu amaçla, bu tez çalışmasının konjenital aritmi modeli *Casq2*^{-/-} transgenik fare hattı ve vahşi tip fareler ile yürütülen *ex vivo* deneylerinde, CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların fare kalplerindeki lokasyonları ve yoğunlukları incelendi. Atriyoventriküler nod bölgesindeki kardiyak makrofajların kantitatif yoğunluk analizi sonucu, CX3CR1 sinyal yoğunluğunun *Casq2*^{-/-} farelerde, vahşi tip farelere oranla istatistiksel anlamlı olarak azaldığı tespit edildi. Bu sonuç bize CX3CR1 ifadeli makrofaj popülasyonundaki azalmanın konjenital aritmi patogeneğinde rolü olabileceğini gösterdi. Eş zamanlı olarak, voltaj kapılı Na⁺ iyon kanalını kodlayan *SCN5A* gen mutasyonları kaynaklı oluşan konjenital aritmiye sahip bireyler ve sağlıklı kontrollerden monosit kökenli makrofajlar ve uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) temelli kardiyomiyositlerin tekli kültürleri elde edildi. Ardından, aralarındaki morfolojik, moleküler ve fonksiyonel etkileşimler kokültür modellerinde *in vitro* olarak incelendi. Genetik kökeninden bağımsız olarak, makrofajların M2 fenotipine yakın M0 fenotipi sergilediği tespit edildi. Hasta kökenli monositlerin gen ifadesi açısından M1 benzeri moleküler karakter gösterdiği belirlendi. Hücre içi Ca²⁺ görüntüleme, video temelli fonksiyonel kasılma ve ritim analizi sonucu, kokültürlerde sağlıklı kardiyomiyositlerle etkileşim halindeki makrofajların, kardiyomiyositlerin atım frekansını istatistiksel anlamlı olarak hızlandırdığı tespit edildi. Önemli olarak, sağlıklı makrofajların taşikardi fenotipi gösteren kardiyomiyositlerin atım hızlarını istatistiksel anlamlı bir şekilde yavaşlatarak, iyileştirici ve ritim düzenleyici etkiye sahip olduğu belirlendi. Tamamlanan bu kapsamlı ve kontrollü çalışma dahilinde, konjenital aritmi patogeneğinde makrofajların kardiyomiyositler üzerine moleküler, hücrel ve fizyolojik etkileri literatürde ilk defa incelenmiş olup özgün verilere ulaşılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda, sağlıklı makrofaj popülasyonu hücrel tedavi alanında kullanılarak aritmi tedavisinde başarı sağlanabilir.

Anahtar Kelimeler: Kardiyak makrofajlar, konjenital aritmi, uPKH-temelli kardiyomiyosit, monosit izolasyonu, transgenik aritmi fare modeli.

Bu araştırma TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı tarafından 218S841 nolu Proje kapsamında desteklenmiştir.

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE INTERACTION BETWEEN CARDIOMYOCYTES AND MACROPHAGES IN THE PATHOGENESIS OF CONGENITAL ARRHYTHMIA IN *IN VITRO* AND *IN VIVO* MODELS

The electrophysiological roles of the immune system in the pathogenesis of congenital arrhythmias, causing morbidity and mortality in the world, are not yet understood. Cardiac macrophages have been discovered that they regulate the contraction profiles of healthy murine hearts however, have not been studied in human and mouse arrhythmia models. In this thesis, the locations and intensities of CX3CR1⁺ cardiac macrophages in the heart tissues of healthy and *Casq2*^{-/-} transgenic mice, a ventricular tachycardia disease model, were investigated *ex vivo*. As a result of quantitative intensity analysis of the macrophages in the atrioventricular node region, CX3CR1 signal intensity was found to be statistically significantly reduced in *Casq2*^{-/-} transgenic mice compared to the wild-type group. This result showed us that decrease in CX3CR1⁺ cardiac macrophages in the heart may have a role in the pathogenesis of congenital arrhythmias. Simultaneously, monocultures of monocyte-derived macrophages and induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cardiomyocytes were obtained from healthy controls and congenital arrhythmia patients carrying mutations in *SCN5A* gene encoding the voltage-gated Na⁺ channel protein. Subsequently, the morphological, molecular, and functional interactions were investigated in *in vitro* coculture models. Independent of the genetic background, macrophages exhibited naïve and M2-like phenotype, while patient-derived monocytes showed M1-like molecular characteristics in terms of gene expression. As a result of intracellular Ca²⁺ imaging, video-based functional contraction, and rhythm analysis, the macrophages interacting with healthy cardiomyocytes in cocultures significantly accelerated the beating frequency of the cardiomyocytes. Importantly, healthy macrophages slowed down the beating rates of cardiomyocytes exhibiting tachycardia phenotype in a statistically significant way, indicating a curative and rhythm-regulating effect of healthy macrophages. Within the scope of this comprehensive and controlled study, the molecular and physiological interactions between macrophages and cardiomyocytes in the pathogenesis of congenital arrhythmia were examined for the first time in the literature. In line with the data obtained from this study, successful treatment of arrhythmia can be achieved by using the healthy macrophage population in the field of cellular therapy.

Keywords: Cardiac macrophages, congenital arrhythmia, iPSC-derived cardiomyocyte, monocyte isolation, transgenic mouse model of arrhythmia.

This study was supported by TÜBİTAK under 1002 Scientific and Technological Research Projects Funding Program by project no: 218S841.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Konjenital aritmilerin genetik temelini, kardiyomiyositlerin kasılmasında görevli iyon kanalları ve taşıyıcı proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar oluşturmaktadır. Bu mutasyonlar sonucu membran potansiyelinde ve iyon geçişinde oluşan bozukluklar neticesinde konjenital aritmiler meydana gelmekte ve dünyada yüksek oranda morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır (1, 2). Semptomları erken yaşta ortaya çıkan konjenital aritmiler, elektrokardiyografik (EKG) ölçümler ile teşhis edilebilmektedir ve genetik testler sonucu kaynaklandığı mutasyonlar incelenebilmektedir. Popülasyonda insidansı 1:10,000 ve üzerinde olan konjenital aritmilerin en sık görülen formları; ventriküler taşikardi, Uzun QT sendromu (UQTS), kısa QT sendromu, Brugada sendromu, katekolaminerjik polimorfik ventriküler taşikardi (CPVT) ve atriyal fibrilasyondur (3, 4). Son yıllarda yapılan çalışmalar immünolojik parametrelerin aritmiler için önemli bir risk faktörü olabileceğine işaret etmektedir (5). Tedavi yaklaşımı olarak, kardiyoversiyon, ablasyon tedavisi, pacemaker (pil) tedavisi, cerrahi müdahale, beta blokörler ve kalsiyum iyonu (Ca^{2+}) kanal blokörleri gibi ilaç tedavilerine başvurulmaktadır. Kimyasal ilaçlarla yapılan tedavilerin yan etkileri olmakla birlikte, tedavi yöntemlerinin genelinde etkili ve kalıcı bir düzelme sağlanamamaktadır (6–8). Bu sebeple, biz bu tez çalışmasında literatür bulguları doğrultusunda (9, 10), immünolojik kökenli alternatif tedavilerin gelişmesi açısından konjenital aritmi immünopatogenezinde makrofajların iyileştirici ve ritim düzenleyici rolleri olabileceğine odaklandık.

Yakın bir zamana kadar kalbin kardiyomiyosit, vasküler endotel hücreler, kardiyak fibroblastlar ve düz kas hücrelerinden oluştuğu bilinmekteydi (11). Ancak, son yıllarda kemirgen kalbi üzerinde yapılan histolojik ve fonksiyonel çalışmalar 'kardiyak makrofajlar' olarak tanımlanan kalp dokusuna özgü makrofajların varlığını göstermiştir (12–15). Deney hayvanlarında yapılan bir çalışmada, kardiyak makrofajların yoğunlukla atriyoventriküler (AV) nod bölgesinde lokalize olduğu ve immün sistem hücresi olarak bilindik rollerinin yanı sıra kardiyomiyositlerin elektrofizyolojik özelliklerini düzenlediği, *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir (9). İlginç bir şekilde bu düzenlenmenin, makrofajlar ve kardiyomiyositler arasındaki koneksin 43 (CX43) oluklu bağlantı (gap junction) proteini aracılığıyla olduğu belirtilmiştir (9, 10). Söz konusu bulgular sadece sağlıklı fare kalbinden elde edilmiş

olup kardiyak aritmi patogeneğinde makrofajların immünoregülatör rolünü inceleyen bir çalışma literatürde mevcut değildir. Ayrıca, insan kökenli kardiyomiyositler ve makrofajları kullanarak oluşturulmuş bir kokültür platformunda, hücreler arasındaki fizyolojik ve moleküler etkileşimi inceleyen bir çalışmaya da henüz rastlanmamıştır. Bunun  zerine, hipotezimizi sağlıklı veya konjenital aritmi kökenli kardiyomiyositler ve makrofajların etkileşimini insan ve fare modellerinde incelemeye yönelik olarak geliştirdik.

Bu tez çalışmasına başlarken araştırma sorularımız;

- **Konjenital aritmi hastalık modeli transgenik fare hattında kardiyak makrofajların anatomik / histolojik yerleşimi ve yoğunluğu farklı mıdır?’**
- **Konjenital aritmi hastalığında insan kökenli kardiyomiyositler ile etkileşim halindeki makrofajların, kardiyomiyositlerin atım frekansını değiştirici ve ritmini düzenleyici fonksiyonel bir etkisi var mıdır?**
- **Bu etkileşimde makrofajların alt tipleri etkin olabilir mi?**

Tüm bu sorularımıza cevap bulabilmek için, öncelikle katekolaminerjik polimorfik ventriküler taşikardi (CPVT) hastalık modeli sergileyen *Casq2* geni çıkartılmış ve dolayısıyla bu genin ürünü olan kalsekuestrin proteini üretilmeyen (*Casq2*-null) *Casq2*^{-/-} transgenik hayvanlar ve vahşi tip sağlıklı farelerden deney grupları oluşturuldu. Fenotipleri doğrulamak amacıyla vahşi tip ve *Casq2*^{-/-} farelerin EKG analizleri yapıldı ve veriler incelendiğinde, aritmik ve taşikardik bir EKG profili sergileyen *Casq2*^{-/-} farelerin CPVT modeli olduğu doğrulandı. Ardından, vahşi tip ve *Casq2*^{-/-} farelerin kalp dokularından kesitler alınarak, AV nodun lokasyonu anatomik olarak mason trikrom boyama yöntemi ile tespit edildi. Bu kesitlerde, F4/80⁺ ve CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların lokasyonları immünfloresan boyama yöntemi ile *ex vivo* olarak incelendi. CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların tüm kalpteki yerleşimi açısından vahşi tip ve *Casq2*^{-/-} fareler arasında bir fark gözlenmedi. Fakat, *Casq2*^{-/-} farelerin AV nod bölgelerinde CX3CR1⁺ kardiyak makrofajlar, vahşi tip sağlıklı farelere oranla daha az yoğunlukta ydı. Bu sebeple, iki grup arasında CX3CR1 antikor reaktivitesinin sinyal yoğunluğu farkı kantitatif olarak hesaplandı ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı. CX3CR1⁺ makrofajların kantitatif yoğunluk analizi sonucu, CX3CR1⁺ yoğunluğunun *Casq2*^{-/-} farelerde vahşi tip farelere oranla istatistiksel anlamlı olarak

azaldığı tespit edildi. Bu sonuç bize CX3CR1 kemokin sinyal yolağının aktivasyonunda oluşan bir azalmanın konjenital aritmi patogenezinde rolü olabileceğini gösterdi.

Transgenik fare soyu ile yürütülen çalışmalarla eş zamanlı olarak, insan kökenli hücreler ile oluşturduğumuz *in vitro* kültür sistemlerinde kardiyomiyosit ve makrofaj etkileşimi incelendi. Bunun için öncelikle sağlıklı bireylerden ve konjenital aritmi hastalarından kardiyomiyosit ve makrofaj tekli kültürleri elde edildi.

Kalp hastalığı bulunan bireyden kardiyomiyosit hücrelerinin biyopsi ile temini ve hücre kültürü boyutunda çoğaltılarak incelenmesi mümkün olmadığı için, bu çalışmada bireye özgü kardiyomiyositlerin eldesinde uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) teknolojisi kullanıldı (16, 17). Konjenital aritmi hastalığının uPKH'ler ile *in vitro* olarak modellenebilmesi, hastalığın patogenezinin ve immün hücreler ile etkileşiminin araştırılmasına olanak sağlamaktadır. Kardiyomiyosit hücre membranlarında ifade edilen voltaj kapılı Na⁺ iyon kanalını kodlayan *SCN5A* gen mutasyonu taşıyan ventriküler taşikardi hastası ve sağlıklı bireyin venöz kanından elde edilen somatik hücrelerden kişiye özgü uPKH hatları oluşturuldu. Bununla birlikte, WNT sinyal yolağı manipülasyonu ile uPKH'lerinden kardiyomiyosit kültürleri farklılaştırıldı. *SCN5A*^{F1465L/+} iyon kanalı mutasyonu taşıyan hasta ve sağlıklı birey kökenli kardiyomiyositlerin moleküler ve fonksiyonel karakterizasyonlarının incelenmesinin ardından kokültürler oluşturuldu. Makrofaj hücreleriyle ekilmek üzere kokültür gruplarının oluşturulmasında, kardiyak kültürlerinin 30-45. gün arasındaki olgunlaşmış kardiyomiyosit hücrelerinden faydalanıldı. Bu hücrelerin çeşitli enzimatik yollarla ayrıştırılması ve uygun matrisler üzerine ekilmesiyle yeniden ekim optimizasyonları oluşturuldu (18, 19).

Bununla birlikte, sağlıklı ve *SCN5A*^{delKPQ/+} mutasyonu taşıyan Uzun QT sendromu tip-3 (UQTS-3)/Brugada sendromu teşhisi almış hastaların venöz kan hücrelerinden MACS yöntemi ile izole ettiğimiz CD14⁺ monositlerden, makrofaj-spesifik büyüme faktörleri varlığında naiv makrofaj kültürleri elde ettik. Monositler ve farklılaştırılan makrofaj kültürleri M0/M1/M2 makrofaj fenotipleri açısından moleküler olarak karakterize edildiğinde, genetik kökeninden bağımsız olarak sağlıklı ve hasta kökenli makrofajların M2 fenotipine yakın M0 fenotipi sergilediği tespit

edildi. Önemli bir bulgu olarak, *SCN5A* iyon kanalı mutasyonu taşıyan hasta kökenli monositlerin gen ifadesi açısından M1 benzeri moleküler karakter gösterdiği belirlendi.

Her iki hücre tipinin fonksiyonel ve moleküler karakterizasyonları yapıldıktan sonra, sağlıklı ve hasta kökenli kardiyomiyosit ve makrofajların çeşitli kombinasyonlarını içeren kokültür modelleri oluşturuldu. Literatürde, bu iki hücre tipini içeren herhangi bir kokültür protokolü mevcut olmadığı için besiyeri bileşenleri, hücre sayısı ve kültür süresi gibi kültür şartlarını optimize etmeyi hedefledik. Kokültürlerde hücreler arası membran temelli fiziksel bağlantıları çeşitli mikroskopi teknikleri ile morfolojik açıdan gözlemledik. Literatürde fare AV nod kardiyomiyositleri ve ventriküler kardiyomiyositlerin makrofajlarla CX43 oluklu bağlantı proteini vasıtasıyla iletişim kurduğu gösterilmiştir (9, 10). İnsan kökenli hücreler ile oluşturduğumuz kokültürlerde yürüttüğümüz immünohistokimyasal boyamalar sonucu, kardiyomiyositler arasında CX43 proteini gözlenirken kardiyomiyositlerle membran bağlantısı kurduğu WGA membran-spesifik boyamalarla belirlenen makrofajları içeren bölgelerde CX43 bağlantı proteini gözlenmedi. Ayrıca, kokültürlerde yürütülen gen ifade analizlerinde, sağlıklı hücreleri içeren kokültürde M2 makrofaj fenotipi köken aldıkları monositlere oranla yükselmiş olarak hesaplanırken, hasta kaynaklı hücreleri içeren kokültürde M1 polarizasyonu, hücrelerin köken aldıkları konjenital aritmi hastasından izole edilmiş monositlere oranla arttığı tespit edildi. Bu sonuç, sağlıklı ve hasta kaynaklı hücrelerle oluşturduğumuz kokültür gruplarında, bireylerin gerçek fizyolojisini modelleyebildiğimizi göstermiştir.

Makrofajların kardiyomiyositlerin atım profilleri üzerindeki etkisi araştırmak için, tekli ve kokültürlerde hücre içi Ca^{+2} iyonuna bağlı spontan aktivitenin ölçüldüğü Ca^{+2} görüntüleme ve fonksiyonel kasılma analizleri gerçekleştirildi. Makrofajlarla membran teması kuran kardiyomiyositler ve makrofajlar arasındaki iyon geçişleri hücre içi Ca^{+2} görüntüleme yöntemiyle görüntülendi ve kasılma sırasındaki iyon geçişi grafikleri oluşturularak kardiyomiyositlerin atım paternleri incelendi. Aydınlık alan özelliği ile kaydedilmiş videolardan gerçekleştirilen MUSCLEMOTION isimli fonksiyonel kasılma ve ritim analizi sonucu, kokültürlerde sağlıklı kardiyomiyositlerle etkileşim halindeki makrofajların, genetik kökeninden bağımsız olarak,

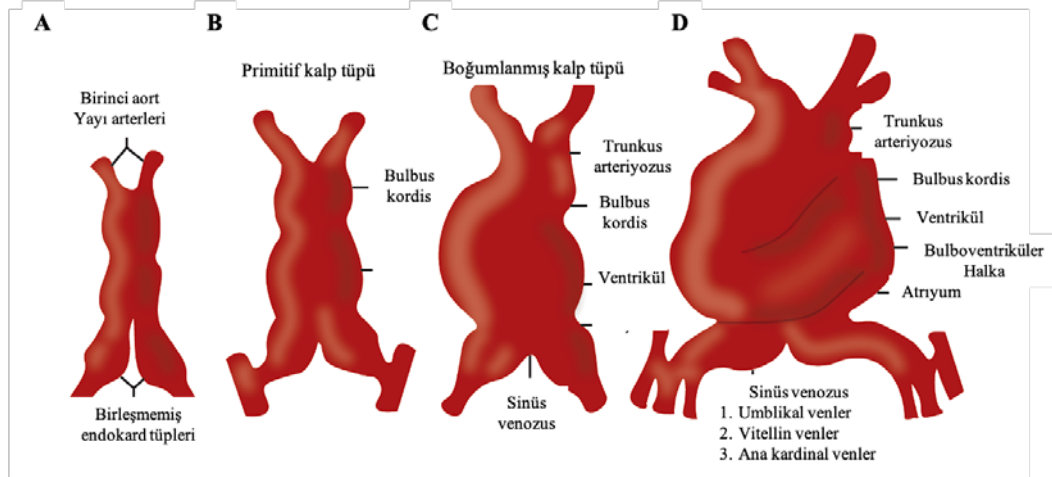
kardiyomiyositlerin atım frekansını istatistiksel anlamlı olarak hızlandırdığı hesaplandı. Bunun yanında, sağlıklı makrofajların, taşikardi ve aritmi fenotipi gösteren kardiyomiyositlerin atım hızlarını istatistiksel anlamlı bir şekilde yavaşlatarak ve ritmini düzenleyerek iyileştirici bir etkiye sahip olduğu tespit edildi. Bununla birlikte, hasta kökenli kokültür gruplarındaki makrofajlar ve kardiyomiyositlerin aralarındaki Ca^{+2} geçişinin korelasyon analizi sonucu, en yüksek korelasyon bu grupta tespit edildi ve bu durum hücrelerin sahip olduğu fonksiyon kazanımı mutasyonu sebebiyle aralarındaki iyon geçişindeki normalin üzerinde artışla açıklanabilir.

Bu tez çalışmasının ilk önemli noktası, insan kökenli kardiyomiyositler ve makrofajların etkileşimlerinin incelenmesi, uygulanabilir ve optimize edilmiş *in vitro* kokültür protokolünün literatüre kazandırılmış olması yönleriyle özgün bir değere sahiptir. Konjenital aritmilerdeki ritim bozukluğunun sağlıklı makrofajlar tarafından iyileştirilmesi ve düzenlenmesi, gelecekte daha ileri seviyelere geliştirilmiş *in vitro* kokültür platformlarında araştırılabilir ve hücreler arası detaylı bağlantılar üzerine yapılacak analizler tek hücre seviyesinde çalışılabilir. Özetle bu tezin anlam ve önemini, bulgularımızın primitif fakat yenilikçi bir bakış açısı sunan veriler içermesi bakımından gelecekte yapılacak hücresel tedavilere öncülük edebileceği hipotezi oluşturmaktadır.

4. GENEL BİLGİLER

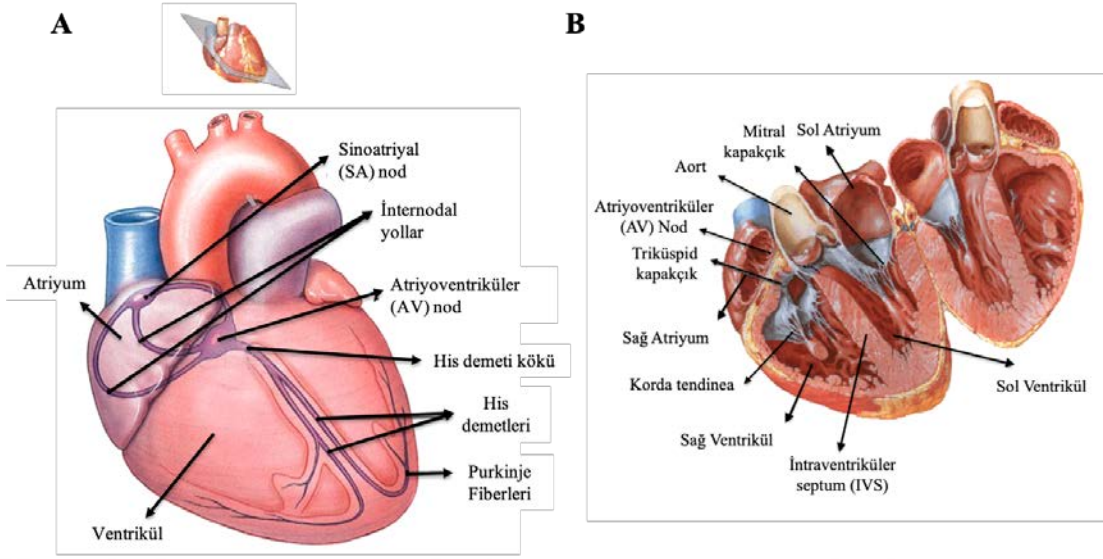
4.1 Kalp Gelişimi, Anatomisi ve Fizyolojisi

Embriyonik gelişimin erken safhası gastrulasyon sürecinde, embriyonik kök hücrelerden ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakaları farklılaşır (20). Ektoderm hücrelerinden, sinir sistemi ve epidermis oluşurken, endoderm hücrelerinden bağırsaklar ve birçok iç organ meydana gelir. Mezoderm tabakasından ise, vücuttaki kas hücreleri ve bağ dokusu oluşur. İnsan embriyo gelişiminin yaklaşık 18. gününde embriyonun dorsal bölgesinde gelişen ilkel (primitif) çukurdan intraembriyonal mezoderm hücreleri ventrale doğru göç eder. Bu hücrelerin bir kısmı, nöral plağın ön ve yan kısımlarına giderek at nalı şeklinde kardiyojenik bölgeyi meydana getirir (21). Kardiyojenik bölgenin üzerinde intraembriyonal sölom boşluğu oluşur. Bu boşluk ileride kalbi çevreleyen fibröz bir kese olan perikardiyumu oluşturacaktır. Ondokuzuncu günde kardiyojenik bölgede vaskülogenez ile endokard tüpleri oluşur. Endokard tüpleri, gelişimin 30. gününe doğru embriyonun göğüs boşluğunun anterior kısmına gelerek ileride kalbin oluşacağı bölgede yerini alır (Şekil 4.1 A) ve embriyonun baş tarafından kuyruğa doğru hareket ederek birleşir. Böylece primitif kalp tüpü oluşur (Şekil 4.1 B). Primitif kalp tüpünün uzayıp boğumlanmasıyla kalp tüpünde, trunkus arteriyozus, bulbus kordis, ventrikül, atriyum ve sinüs venözus yapıları oluşur (Şekil 4.1 C). Trunkus arteriyozusun kranyal ucunda aort kesesi şekillenir. Kalp tüpünde kuyruğa yakın kısmında bulunan sinüs venözusa doğru, umbilikal venler, vitellin venler ve ana kardinal venler meydana gelir (Şekil 4.1 D) (22). Primitif kalp tüpü, gelişimin 22. gününde mezoderm öncülü (progenitor) hücre tabakası ile sarılır. Bu tabakadan; kalp kası miyokardiyum, kardiyak jel ve perikardiyumun üst tabakası epikardiyum meydana gelir. Miyokardiyumun iç yüzeyini döşeyen endotel hücreleri endokardiyumu oluşturur. Birinci ayda bulbus kordis ve ventrikül hücreleri daha hızlı gelişerek kalp tüpünün kendi üzerinde eğim yapmasına sebep olarak bir halka yapısı oluşturur.



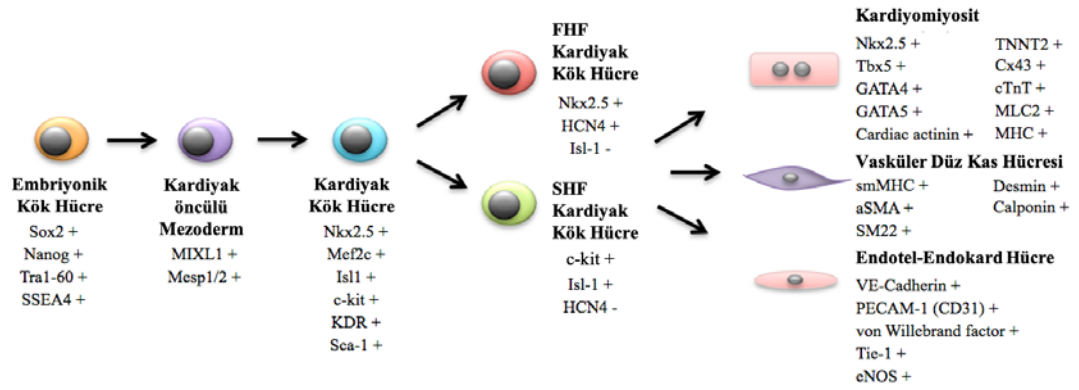
Şekil 4.1 İnsanda kalp gelişimi. (A) Birleşmemiş endokard tüpleri. (B) Primitif kalp tüpü. (C) Boğumlanmış kalp tüpü. (D) Venlerin olduğu kalp tüpü. (İnsan Anatomisi Atlası-Netter 2006’dan uyarlanmıştır).

Kalp tüpünün eğimi tamamlanınca atriyum ve ventrikül gibi kalp boşlukları da uzaysal düzlemde yerlerini alır (Şekil 4.2 A). Daha sonra, atriyumlar ve ventriküller arasında endokardiyal bağ dokusundan meydana gelen kalp kapakçıkları oluşur. Ventrikül duvarlarında oluşan kas demetlerinden de, papiller kaslar ve korda tendinealar oluşur (Şekil 4.2 B). Kapakçıklar, ventriküller kasıldığında kanın atriyumlardan ventriküllere dönmesini engeller. Sol atriyum ve ventrikül arasındaki kapağa mitral (biküspid), sağ atriyum ve ventrikül arasındaki kapağa triküspid kapak adı verilir (Şekil 4.2 B) (22). Atriyumların arasındaki yapı interatriyal septum (IAS), ventriküllerin arasındaki yapı ise interventriküler septumdur (IVS) ve IAS kas dokusu IVS kas dokusundan daha ince yapıdadır. Kalbin gelişimi sonlandığında kalbin elektriksel ileti sistemi elemanları, kalp boşlukları (odacıkları), boşlukların aralarında bulunan septumlar ve kapakçıkların oluşumu tamamlanmış olur (Şekil 4.2) (21).



Şekil 4.2 Kalbin anatomik yapısı. (A) Uzaysal düzlemde kalbin odacıklarını ve elektriksel ileti sistemini gösteren şekil. (B) Kalbin uzunlamasına alınmış kesitinden kalbin iç yapılarını gösteren şekil. (İnsan Anatomisi Atlası-Netter 2006’dan uyarlanmıştır).

İnsan embriyonik kök hücrelerden ($SOX2^+$, $NANOG^+$), *BRACHYURY* ve *MESP1* gibi transkripsiyon faktörlerinin ifade olmasıyla mezodermal hücreler farklılaşır (Şekil 4.3) (24). Kardiyak öncülü (pre-kardiyak) mezodermal hücrelerde ifade olan kardiyak spesifik transkripsiyon faktörleri ile (*NKX2.5*, *MEF2C*, *ISL1*, *C-KIT*), birincil kalp alanı (FHF: first heart field, $NKX2.5^+$, $HCN4^+$) ve ikincil kalp alanında (SHF: second heart field, $ISL1^+$, $C-KIT^+$) yer alan hücreler oluşur (Şekil 4.3) (25, 26). Bu faktörlerin ifadesiyle, birincil kalp alanındaki kardiyak kök hücreler, sol ventrikül ve atriyumların bir kısmını, ikincil kalp alanındaki kardiyak kök hücreler ise sağ ventrikül, kardiyak çıkım yolu (outflow tract) ve atriyumların kalan kısımlarını oluşturur. Kardiyak kök hücrelerden temelde üç tip hücre çeşidi köken alır, bunlar; kardiyomiyositler, vasküler düz kas hücreleri, endotel ve endokard hücreleridir (Şekil 4.3). Bunların yanında, kardiyak fibroblastlar ve perisitler de kardiyomiyositlere destekleyici şekilde görev alır. Kardiyomiyositlerde spesifik olarak ifade edilen genler başlıca; *GATA4*, *MYH6*, *MYH7*, *CTNT*, *MLC2A*, *MLC2V*’dir (Şekil 4.3) (24, 25, 27–29).

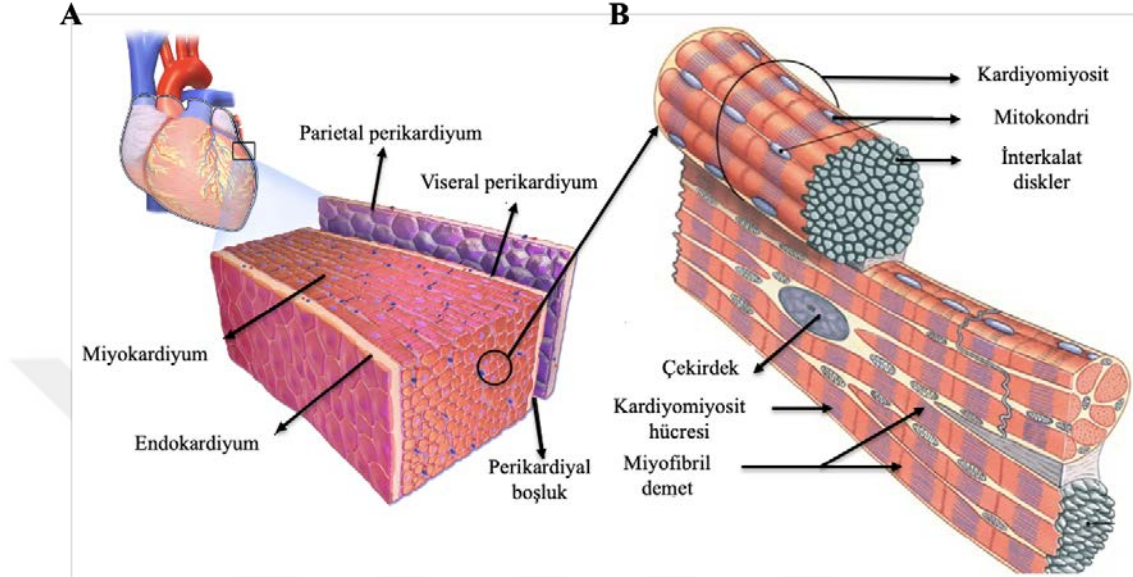


Şekil 4.3 Kardiyak gelişimin hücreleri ve gelişimde görevli transkripsiyon faktörlerini gösteren şema. FHF: Birincil kalp alanı. SHF: İkincil kalp alanı. CTNT: Kardiyak troponin T, MLC2A/V: Miyozin hafif zincir 2A atriyal/ventriküler form, GATA4: GATA Binding Protein 4, MYH6: Miyozin ağır zincir α . MYH7: Miyozin ağır zincir β . (Çağavi 2016'dan uyarlanmıştır).

Kalp içten dışa olmak üzere, endokardiyum, miyokardiyum ve perikardiyum tabakalarından oluşur (Şekil 4.4 A). Perikardiyum tabakası, kalbi saran zar olup sürtünmenin zararlı etkisini önler, kalp kasılmasının mekanik etkisinden akciğerleri korur ve kalbin dilatasyonuna engel olur. Perikardiyum kan damarları ve sinir hücrelerince zengin bağ dokudan meydana gelir (23, 30). Endokardiyum, kalbin en iç kısmını kaplayan endotel hücre tabakasından oluşmuştur. Endokardiyum ile miyokardiyum arasında subendokard tabakası vardır. Subendokard tabakası, nöronlar, endotel hücreler ve kalbin uyarı sistemi hücrelerini içerir. Miyokardiyum ise kalpteki en kalın kas tabakasıdır, endokardiyum ve perikardiyum arasında bulunur ve kardiyomiyositler hücrelerinden oluşur (Şekil 4.4 B) (23, 31).

Kardiyomiyosit hücreleri tek veya çok çekirdek içerebilir ve enerji ihtiyacını karşılaması bakımından hücre içlerinde çok sayıda mitokondri organelleri bulunur. Kardiyomiyositler çizgili kas yapısındadır ve birleşerek miyofibril demetlerini oluşturur (Şekil 4.4 B). Kardiyomiyositlerin hücre membranı olan sarkolemma üzerinde, çeşitli iyon kanalları, taşıyıcıları ve pompaları bulunur. Kardiyomiyositlerin içerisinde sarkoplazmik retikulum (SR) adıyla özelleşmiş organeller bulunur ve SR'ler Ca^{2+} iyonu deposudur. Kardiyomiyositler birbirlerine koneksin proteinlerini içeren interkalat diskler ile bağlıdır (Şekil 4.4 B). Kardiyomiyositler kasıldığında oluşan

elektriksel akım ve depolarizasyon dalgası, interkalat diskler vasıtasıyla komşu hücrelere iletilir (9, 23, 32).



Şekil 4.4 Kalbin tabakaları ve kardiomyositlerin yapısı. (A) Kalbin tabakaları ve (B) miyokardiyum dokusunu oluşturan ve kardiomyosit hücrelerinden oluşan miyofibril yapısı. (Koç 2021’den uyarlanmıştır).

Miyokardium tabakasının total hacminin üçte ikisini oluşturan kardiomyositler, hücre sayısı bakımından ise toplam miyokardiyal hücrelerinin üçte biridir (33). Kardiomyosit hücreleri kontraktıl (kasılan) kardiomyositler ve uyarı (impuls) üretilen özelleşmiş kardiomyositler olarak ikiye ayrılır. Kardiomyositlerin olgunlaşarak sağlıklı bir şekilde fonksiyonlarını ve metabolik aktivitelerini sürdürmeleri bazı faktörlere bağlıdır. Bu faktörler; biyokimyasal ve yapısal destek sağlayan ekstraselüler matriks elemanları, bu elemanları üreten fibroblastlar, endotel hücreleri ve kasılmayı koordine ederek elektriksel iletim sağlayan His-Purkinje hücreleridir (34).

4.2 Kalpte Elektriksel İletim Sistemi

Kalpte bir uyarı meydana geldiği zaman kalbin tamamı kasılmış olur. Kalbin bu özelliğine fonksiyonel sinsityum denir. Kalp iki ayrı sinsityum şeklinde fonksiyon

görür, bunlardan biri atriyumların diğeri ise ventriküllerin sinsityumudur. Bu şekilde uyaran şiddetine bağlı olarak kalp ya bir bütün olarak kasılır ya da hiç kasılmaz. Bu duruma kalbin “hep ya da hiç ilkesi” denir. Bu ilke atriyum ve ventriküller için ayrı ayrı gerçekleşir. Atriyumlarda oluşan bir aksiyon potansiyeli, atriyumların tümünün kasılmasına yol açarken, bu uyarının kalbin elektriksel ileti sistemi sayesinde ventriküllere iletilmesiyle ventriküller kasılır. Fakat, ventriküllerde meydana gelen aksiyon potansiyelleri sadece ventrikül içinde yayılabilir, geriye doğru atriyumlara geçemez. Tüm bu özellikler dikkate alındığında kalp kasının dört fizyolojik özelliği olduğu gözlenmektedir. Bunlar; kronotropi (kendini uyarma), dronotropi (iletme), batmotropi (uyarılabilme) ve inotropi (kasılma) olup, kronotropi sinoatriyal (SA) nod hücrelerine, dronotropi atriyoventriküler (AV) nod hücrelerine, batmotropi ve inotropi ise kardiyomiyositlere özgü özelliklerdir (23, 35).

Kalp kası, vücut dışında ve uygun deneysel ortamda otonom olarak aksiyon potansiyeli oluşturabilir. Buna “uyarı üretici (pacemaker)” özelliği denir. Kalbin uyarı üretici özelliğine sahip yapıları; SA nod, AV nod, sağ ve sol His demetleridir (Şekil 4.2 A) (36). SA nod, superior vena kava ile sağ atriyumun birleştiği yerde atriyal duvarda bulunur. AV nod ise, iki atriyum arası IAS bölgesinde subendokardial yerleşmiştir ve aşağı sağ atriyum tarafında lokalizedir. Bu yapılardaki hücreler, özelleşmiş tipteki kardiyomiyositler olup miyokardiyumda bulunan diğer tip kasılan kardiyomiyosit hücrelerinden yapısal farklılıklar gösterir. SA ve AV nodda bulunan uyarı üretici kardiyomiyositlerin glukoz içerikleri fazladır, bu nedenle çeşitli boyamalar sonrası mikroskop altında kasılan kardiyomiyositlere göre açık renkli gözlenir. Ayrıca AV nod kardiyomiyositlerinin miyofibriller yapıları daha büyük olup çekirdekleri fazla belirgin değildir. AV nodun devamında kalbin ventriküllerine yayılan His demetleri, etrafındaki komşu miyokardiyum tabakasından fibröz bir doku ile ayrılan elektriksel iletinin devam ettirildiği özelleşmiş kısımlardır. His demetleri, ventriküller ile atriyum arasındaki tek iletim dokusudur (23, 31, 36).

4.2.1 Kalpte aksiyon potansiyeli

Kalbin kasılması kardiyomiyositlerde aksiyon potansiyelinin oluşması ile başlar. Aksiyon potansiyeli eğrisinin beş fazı vardır. Bunlar;

- Faz 0: Hızlı depolarizasyon
- Faz 1: Erken repolarizasyon
- Faz 2: Plato
- Faz 3: Final repolarizasyon
- Faz 4: Dinlenme halindeki membran potansiyeline karşılık gelir (Şekil 4.5 A).

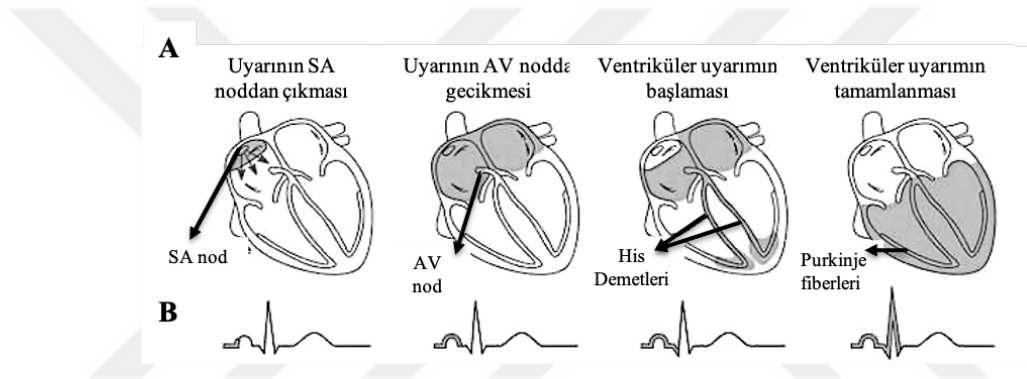
Şekil 4.5 Kardiyak aksiyon potansiyeli fazları ve kasılmada görevli iyon kanalları. (A) Aksiyon potansiyeli fazlarını gösteren şekil. (B) Aksiyon potansiyelinde görevli iyon kanalları ve akımlar. $Ca_v1.2$: L tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalı. $Na_v1.5$: Voltaj bağımlı sodyum kanalı. $Caq2$: Kalsekuestrin 2. $Ryr2$: Ryanodin reseptör 2. SR: Sarkoplazmik retikulum. Ca^{2+} : Kalsiyum iyonu. K^+ : Potasyum iyonu. Na^+ : Sodyum iyonu. Iks: Yavaş potasyum akımı. Ikr: Hızlı potasyum akımı. (Ruan 2009'dan uyarlanmıştır).

arasında potansiyel fark oluşur ve membran potansiyeli -60 mV'dan -40 mV'a ulaşır. Depolarizasyon dalgası ile L tipi kalsiyum (Ca^{+2}) kanalları açıldığında Ca^{+2} iyonları hücre içine akar. Bu noktada hızlı iyon geçişinde, kardiyomiyosit hücreleri arasındaki koneksinler önemli bir rol alır. SERCA reseptörleri ile SR içine giren Ca^{+2} iyonları, SR'deki ryanodin reseptör Ca^{+2} kanalı (RyR2) ile sitozole salınır. Ca^{+2} iyonları, hücre iskelet proteini olan troponinlere bağlanarak kasılmayı başlatır. Bu safhada potasyum akımlarından (I_{Kr} , I_{Ks}) sorumlu kanalların inaktivasyonu nedeniyle hücre dışına K^{+} çıkışı azalır (Şekil 4.5 B). Fazın sonunda Ca^{+2} kanalları kapanır ve depolarizasyon sonlanır (37, 38).

Hızlı ve erken repolarizasyonu simgeleyen Faz 1, Na^{+} akışında azalma ve K^{+} ve Cl^{-} akışında geçici bir artış ile karakterizedir, bu sebeple bu fazda membran potansiyeli +52 mV gibi pozitif bir değerde sabitlenir. Faz 2, aynı anda Ca^{+2} ve Na^{+} girişinin ve K^{+} çıkışının olduğu, membran potansiyelinin neredeyse sabit kaldığı veya yavaşça azaldığı uzun süreli bir plato fazıdır. Faz 3, çoğunlukla artan K^{+} akışı ve azalan Ca^{+2} ve Na^{+} akışı nedeniyle, kalbin diyastolünde (gevşeme) görevli final repolarizasyonu temsil eder. Faz 4 ise, kardiyomiyositlerde diyastoldeki dinlenme membran potansiyelini ve uyarı üreten hücrelerde spontan depolarizasyonu temsil eder (Şekil 4.5 B) (39). Membran repolarizasyonunun sonlandırılmasından ve dinlenme durumundaki membran potansiyelinin yeniden oluşturulmasından I_K kanallarının geç aktivasyonu sorumludur (Şekil 4.5 B) (37, 38, 40, 41).

Kalbin elektriksel ileti sistem elemanları olan SA nod, AV nod ve His demetlerinde, aksiyon potansiyeli fazları ve membran potansiyeli voltaj değerleri farklılık gösterir. SA nodun aksiyon potansiyelinde faz 1 ve 2 yoktur. SA nodda oluşan aksiyon potansiyellerinin ritmine sinüs ritmi denir. Sinüs ritmi normal koşullarda dakikadaki kalp atım hızına (BPM: beats per minute) karşılık gelir. SA nod dakikada 60-80 uyarı çıkarırken, AV nod dakikada 40-60 uyarı çıkarabilir. SA nod ve AV nod bölgelerinde yer alan uyarı ileten hücrelerde dinlenme membran potansiyeli -50 mV değerindedir. SA nodda oluşan aksiyon potansiyeli, sağ atriyumdan ön, arka ve orta olarak üç internodal yolla AV noda ulaşır ve burada bulunan fibröz doku sayesinde duraklatılır. Bu sebeple SA noddan AV noda gelen ileti, aşağı ileti sistemi kısmına yavaşlayarak iletilir. AV nod ikinci en fazla uyarı oluşturan bölgedir fakat normal koşullarda uyarı oluşturmaz (Becker 2006) (42, 43).

Aşağı ileti sistemi elemanları, AV nod ve His demetleridir. His demeti, dakikada 30-40 uyarı çıkarır ve ventrikül miyokardının her tarafına yayılan Purkinje sistemi ile devam eder. Purkinje lifleri ise, dakikada 15-30 uyarı çıkaran ve yüksek glikojen içeren hücrelerdir. Kalbin en büyük hücre tipi olan Purkinje liflerinde elektriksel ileti hızı da en yüksektir (23, 37). AV noddan kalbin apeksine doğru subendokardiyal olarak inen His demetleri, sağ ve sol ventriküllere ayrılarak, depolarizasyon dalgasını devam ettirir ve dalganın ventrikül içerisinde dağılmasını sağlar (Şekil 4.6 A) (23, 37). Bu dalgaların gösterimi elektrokardiyografi (EKG) verilerine bazı dalga ve intervaller şeklinde yansımaktadır (Şekil 4.6 B).

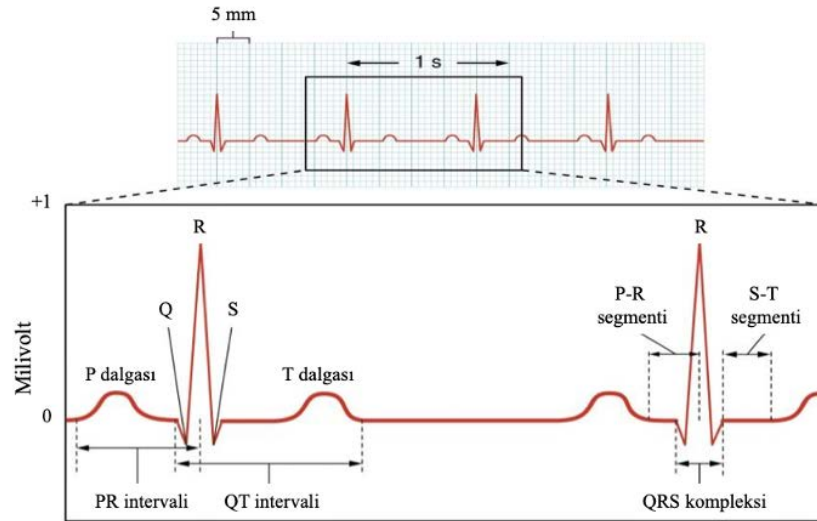


Şekil 4.6 Elektriksel impulsun kalpte yayılışı. (A) Kalpte doğan elektriksel uyarının SA nod, AV nod ve aşağıya uzanan diğer ileti sistemi elemanlarının yerleşiminin kalbin dikey kesiti ile gösterilmesi. (B) Kalbin ileti sistemi ve EKG eğrileri ile eşleşimini gösteren şekil.

4.2.2 Elektrokardiyografi

Galvanometre cihazının icadı ile 1903 yılında Wilhelm Einthoven tarafından bulunan elektrokardiyografi (EKG) sistemi, insanların kalp ritminin paternini ve frekansını ölçmede üzerinde kullanılan bir yöntemdir. EKG, kasılan kardiomyositlerin depolarizasyon ve repolarizasyon döngülerinde vücut yüzeyinde meydana gelen voltaj gradiyentini ölçen bir sistemdir. Kalbe invazif bir yöntem olmaması ve düşük maliyeti nedeniyle EKG, kardiyovasküler hastalıkların teşhisinde ve klinik araştırmalarda çalışmaların ilk adımını oluşturan ve günümüze kadar önemini koruyan tek yöntem olmuştur (41).

EKG verilerinde sıralama her zaman P-QRS-T dalgaları ve intervalleri şeklindedir (Şekil 4.7). EKG ölçümlerinde P dalgası, atriyumdaki hücrelerin depolarizasyonunu yansıtır. Kalpte elektriksel uyarı SA noddan çıkarak önce sağ sonra sol atriya ulaşır için P dalgasının ilk bölümü sağ atriya, diğer bölümü sol atriya depolarizasyonunu gösterir. QRS kompleksi ise, ventriküler depolarizasyonu yansıtır. Depolarizasyon dalgası apekse doğru yayılır ve üç basamakta gerçekleşir (Şekil 4.6 B). İlk olarak ventriküler septum depolarize olur. İkinci aşamada, sağ ve sol ventriküller eş zamanda depolarize olur ve üçüncü aşamada ventrikül duvarları depolarize olur. Bu üç aşamaya ait depolarizasyonlar, farklı derivasyonlarda farklı QRS kompleksleri oluşturabilir. QT intervali, Q dalgasının başlangıcından T dalgasının sonuna kadar geçen süredir ve ventriküllerin depolarizasyonu ve repolarizasyonu için geçen toplam süreyi yansıtır. EKG analizlerinde QT interval süresinin 60/dakika kalp hızına göre normalize edilmiş QTc (QT corrected, düzeltilmiş) sayısı dikkate alınır. T dalgası ise, kardiomyositlerin repolarizasyonunu temsil etmektedir. Normal bir EKG verisinde, her QRS kompleksinden önce P dalgası gelir, R-R intervalleri düzenlidir ve ST segmenti izoelektrik çizgisinde olmalıdır (Şekil 4.6 B) (41).



Şekil 4.7 Standart EKG grafiği ve kalbin ileti sistemin EKG verisi ile eşleşimi. EKG dalga ve intervallerini gösteren grafik. Mm: milimetre.

EKG eğrilerinin karşılık geldiği, kalbin ileti sistem elemanları vasıtasıyla yayılan elektriksel dalgaların iletilmesinde görevli en önemli hücresel yapılar, kardiyak hücreler arasında çeşitli izoformlarda bulunan oluklu bağlantı proteinleri koneksinlerdir (44, 45).

4.2.3 Kardiyovasküler sistemde oluklu bağlantılar

Hücreler arası bağlantıların, doku homeostazında ve fizyolojik süreçlerin devamlılığında önemli rolleri vardır. Hücreler arası bağlantılar; sıkı bağlantılar (tight junctions), dezmozomlar ve oluklu bağlantılar (gap junctions, koneksinler) gibi isimler alırlar (46). Omurgalılarda 22 homolog proteini tanımlanmış koneksinler (Cx), hücrelerin plazma membranlarının aralarında bulunan, sitoplazmik molekül ve iyon alışverişini mümkün kılan birbirine yapışık bağlantı proteinleridir. Bir doku içerisindeki metabolik, elektriksel ve mekanik iletişimin hücreler arasında doğrudan sağlanmasındaki en önemli kanal grubu olan koneksinler zayıf geçirgen özelliktedir. Büyüklüğü 1,2 kilodaltona (kDa) kadar olan küçük moleküller, küçük metabolitler, iyonlar (Ca^{2+} , K^{+}), adenosin trifosfat (ATP), ikincil haberci sinyal molekülleri (cAMP, cGMP, ve IP_3), hormonlar ve glukozun membrandan pasif difüzyon yoluyla geçişine izin veren koneksinler, altı alt birimden oluşur ve plazma membranında por oluşturur. Koneksin proteinlerinin en önemli görevi, Ca^{2+} bağımlı hücresel olaylarda ve hücre içi protein kinaz kaskadlarında rol almasıdır (44, 47).

Kalpde elektriksel uyarının iletimini sağlayan başlıca dört koneksin proteini izoformu ifade edilir (48);

- Cx40, ileri derece iletkenlik sağlayan (200 pS),
- Cx43, orta derece iletkenlik sağlayan (60–100 pS),
- Cx45, küçük derece iletkenlik sağlayan (20–40 pS) ve
- Cx30,2 (veya insandaki izotipi Cx31.9) çok küçük iletkenliğe sahip (9 pS) koneksin proteinleridir (49).

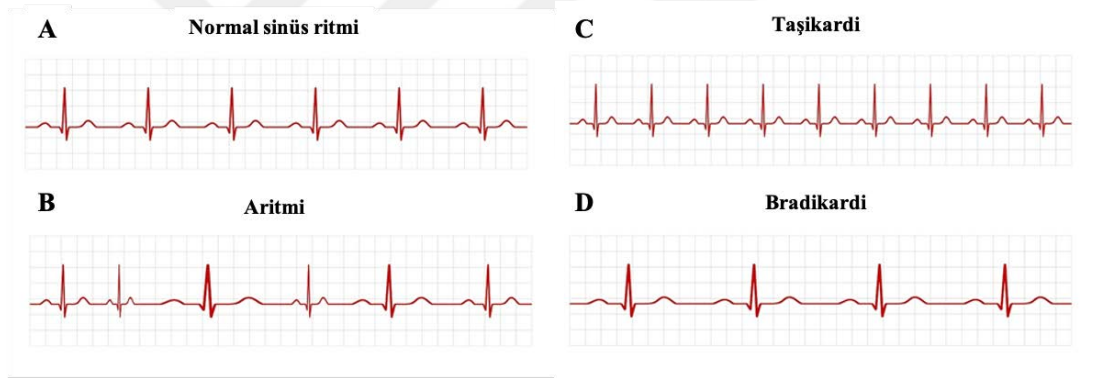
Koneksin proteinleri, kardiyak hücrelerin birbirleri ile bağlantılı olduğu interkalat disklerinde lokalize olmakla birlikte, kardiyomiyositlerin komşu hücrelerle (örn; kardiyak makrofajlar) olan bağlantı bölgelerinde de yer almaktadır (9).

Kardiyomiyositler arasında en yoğun bulunan koneksin çeşidi Cx43 proteinleridir. Çeşitli derecelerde iletkenlik sağlayan koneksinlerin kardiyak ileti sisteminin elemanlarında çeşitli izoformlarda bulunur. SA nodda öncelikli olarak bulunan ve yavaş iletimden sorumlu Cx30,2 ve Cx45 proteinleridir. AV nod ise en çok Cx30,2, daha az miktarda ise Cx45 ve Cx40 içerir (48, 50). SA nod, AV nod ve his demetlerinin ortak içerdiği oluklu bağlantı proteini Cx40 proteinidir.

4.3 Konjenital Aritmiler

Kardiyovasküler kalp hastalıklarında ani ölüm sebeplerinin başında yer alan kardiyak aritmiler, kalbin elektriksel ileti sisteminde oluşan anormallikler sonucu meydana gelen düzensiz sinüs ritmi ile karakterizedir. Kardiyak aritmilerde yorgunluk, çarpıntı, nefes darlığı, göğüs ağrısı veya senkop görülebilir. Kardiyak aritmiler, kalbin elektriksel ileti sisteminin veya kardiyak iyon kanallarının genetik bozuklukları ve miyokardiyal iskemi gibi primer kardiyak olayların sonucu olabileceği gibi, dolaylı olarak sepsis, travma, nörohormonal dengenin regülasyonundaki bozukluklar, metabolik hastalıklar ve toksikolojik problemler sonucu da gelişebilir (2, 51). Dünya Aritmi Birliği'nin 2015 yılında yayınladığı raporlara göre dünya genelinde 20 milyon kalp hastasının 8 milyonu atriyal fibrilasyonu olan hastalardır ve bu sayının 0,54 milyonunda ani kardiyak ölüm görülmüştür (52). Ani kardiyak ölümlerin epidemiyolojisi 35 yaş altı genç bireylerde dünya genelinde yılda 1,3-3,2/100,000 olarak tespit edilmiştir (1). Bu nedenle kardiyak aritmilerin patogenezi anlamak, tedavi yöntemlerinin gelişmesi açısından kritik önem taşımaktadır. Aritmi teşhisinde ilk adım EKG analizleridir. Normal sinüs ritmine ait EKG verilerinde kalp hızı 60-100/dakikadır. (Şekil 4.8 A). Normal sinüs ritminden farklı olarak herhangi bir ritim aritmiye işaret eder (Şekil 4.8 B). Aritmiler; taşikardi, bradikardi ve ekstrasistoller olmak üzere üçe ayrılır. Taşikardiler; atriyal fibrilasyon, atriyal çarpıntı, sinüs taşikardisi, supraventriküler taşikardi, ventriküler fibrilasyon ve ventriküler taşikardi olarak sınıflandırılır. Ventriküler taşikardilerde, ventriküler ektopik bir odaktan 100 atım/dakika'dan daha hızlı, ardışık olarak üç veya daha fazla depolarizasyon meydana gelir (Şekil 4.8 C). Bradikardi, sinüs ritmindeki hızın 60/dakika atımdan az olmasıdır ve aksiyon potansiyelinin başlamasında veya iletimindeki bir gecikmeden kaynaklı

olabilir (Şekil 4.8 D). Bradiairitmiler; sinüs bradikardisi, AV kalp bloğu, AV nod kaçış ritimleri ve ventriküler kaçış ritimleri olarak sınıflandırılır. Ekstrasistoller, kalpte gerçekleşen fazladan atımı tanımlayan bir terimdir (52). Konjenital aritmi hastalıklarının başlıcaları; atriyal fibrilasyon, ventriküler taşikardi, uzun QT sendromu (UQTS), kısa QT sendromu, Brugada sendromu, aritmojenik sağ ventrikül displazisi ve katekolaminerjik polimorfik ventriküler taşikardidir (CPVT) (52). Konjenital aritmilere sebep olan mutasyonlar, farklı iyon kanallarının morfoloji veya fizyolojisini etkileyerek bu kanallarda fonksiyon kaybına veya artmasına sebep olmaktadır (53). Bu mutasyonlar, depolarizasyon ve repolarizasyon döngülerinde görevli elektriksel akımların, iyon kanallarını veya iyon taşınmasında sorumlu proteinleri (Şekil 4.5 B) kodlayan genlerde (örneğin; *SCN5A*, *RYR2*, *KCNQ1*, *KCNH2*, *CACNA1C*, *HCN4*) meydana gelmeleri sonucu konjenital aritmilere sebep olur (39, 54).

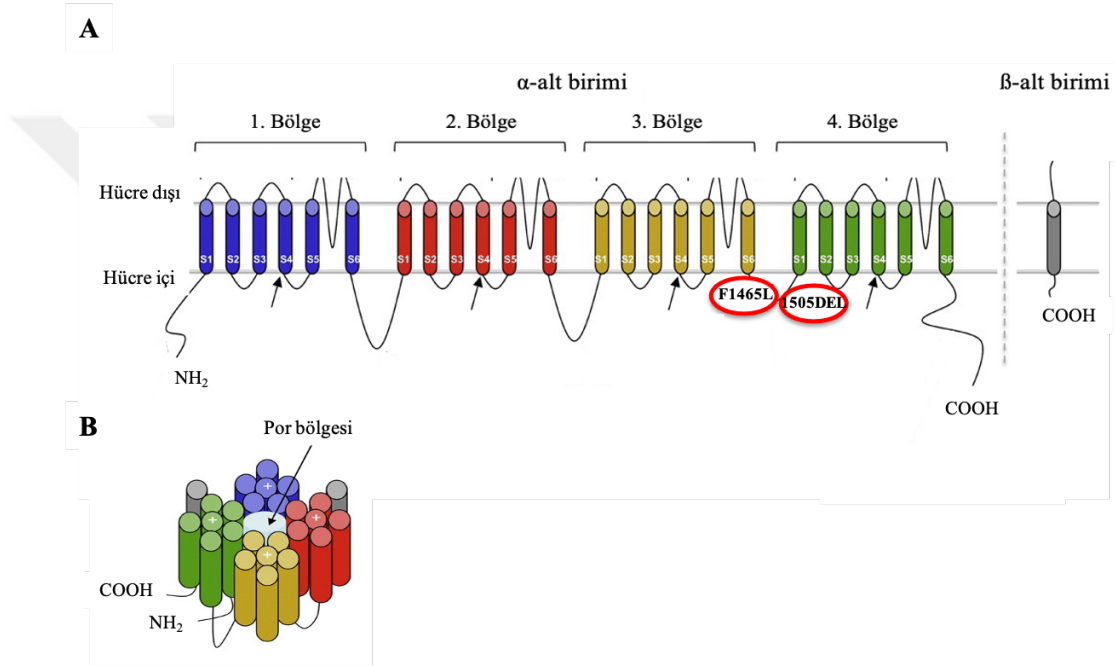


Şekil 4.8 Normal sinüs ritmi ve aritmi çeşitlerini gösteren EKG verileri. (A) Normal sinüs ritmi, (B) Aritmi, (C) Taşikardi ve (D) Bradikardi durumlarına ait örnek EKG çizimleri.

4.3.1 *SCN5A* geni

SCN5A geni insanda 3p21 lokasyonlu, 28 ekzonlu bir gendir ve voltaj kapılı sodium (Na^+) kanalı ailesine mensup $\text{Na}_v1.5$ kanal proteininin α alt birimini kodlar (55). Kanalın diğer alt birimi 30 kDa büyüklüğünde β alt birimidir, α alt birimi ise 220 kDa büyüklüğünde bir proteindir. $\text{Na}_v1.5$ kanalı, dört homolog bölgeden oluşmuş büyük bir transmembran proteindir (Şekil 4.9 A). Her bölgesi voltaj duyarlı olup 6 adet transmembran segmentten oluşur (Şekil 4.9 A) (56). Membran depolarize olduğu zaman $\text{Na}_v1.5$ kanalı, transmembran hareketi yaparak Na^+ iyonlarının hücre içine

girmesini sağlar ve bir sodyum akımı oluşur. Kalbin kasılması sırasında meydana gelen Faz 0 hızlı depolarizasyon ve Faz 2 plato basamaklarında yer alan sodyum akımının (I_{Na}) normal fonksiyonundan sorumlu olan $Na_v1.5$ iyon kanalı, kalpte elektriksel uyarının başlamasında kiritik öneme sahiptir (55, 56). S5 ve S6 segmentleri arasındaki bölge merkezi bir por oluşturur ve bu bölge kanalın iyon selektivitesine karar verir (Şekil 4.9 B). Kanalin N-terminal ve karboksil uçları intraselüler bölgede olup dört bölgesi de intraselüler peptid zincirleri ile birbirine bağlıdır (Şekil 4.9 A) (4, 19, 56).



Şekil 4.9 $Na_v1.5$ kardiyak sodyum kanal proteininin yapısının şematik gösterimi. (A) $Na_v1.5$ kardiyak sodyum kanal proteini açık ve (B) kapalı yapısı. S: Segment. N-terminal (NH₂): Amino ucu. COOH: Karboksil ucu. Bu tez çalışmasında kullanılan SCN5A p.F1465L ve p.1505-1507delKPQ mutasyonlarının lokasyonları şekilde kırmızı yuvarlak içerisinde gösterilmiştir. (Şekil Detta 2015'den uyarlanmıştır).

SCN5A p.F1465L (c.4393T>C)

SCN5A geni 4393. pozisyonundaki T nükleotidinin yerine C nükleotidi gelmesiyle 1465. aminoasidin fenilalanin aminoasidi olması gerekirken lösin aminoasidi kodlanması ile ortaya çıkan p.F1465L (c.4393T>C) isimli tek nükleotid varyantı, fonksiyon kazanımı mutasyonu olarak literatürde yeni tanımlanmış heterozigot bir mutasyondur (Şekil 4.9). Bu mutasyon, MedGen:C1859062 ve OMIM:603830 fenotip

kimlik numaralarına sahiptir (<https://instem.res.in/cardiodatabase/gene/SCN5A/clinvar>).

SCN5A p.1505-1507delKPQ

SCN5A geninde 26. ekzonda yer alan 4511-4519. nükleotid pozisyonları arasındaki AGAAGCCCC nükleotidlerinin delesyonu (Δ) ile 1505. pozisyonda Glisin, 1506. pozisyonda Lizin ve 1507. pozisyonundaki Prolin aminoasitlerinin kaybının sebep olduğu SCN5A p.1505-1507delKPQ isimli fonksiyon kazanımı ve heterozigot mutasyon olarak literatürde tanımlanmıştır (Şekil 4.9) (57, 58). SCN5A p.1505-1507delKPQ mutasyonu depolarizasyon sonrası ilk 20 milisaniyede kanalın tekrar açılmasına sebep olur ve hücre içinde artmış sodyum akımından dolayı gecikmiş repolarizasyon ve uzamış aksiyon potansiyeli ile karakterizdir. Bu mutasyon genellikle UQTS-3'e yol açarken overlap sendromuna da yol açabildiği raporlanmıştır (38).

Na_v1.5 sodyum kanal proteininin temel olarak kardiyomiyositlerde ifade edildiği önceki çalışmalarda gösterilmiş olup bulunduğu diğer dokular ise beyin, gastrointestinal sistem ve kanserli dokulardır (56).

4.3.2 SNC5A gen mutasyonları ilişkili ventriküler aritmiler

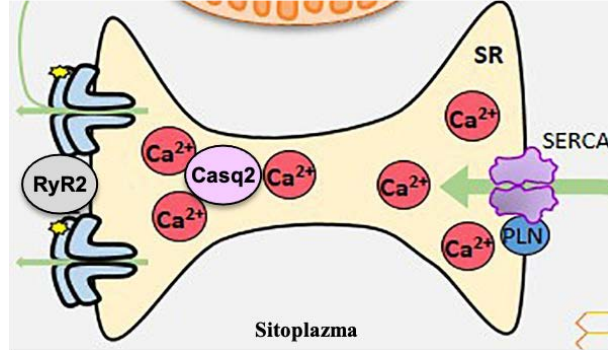
Hastalık ilişkili genetik varyasyonların listelendiği çeşitli açık erişimli platformlarda (ClinVar, SwissVar, Humsavar, gnomAD ve Ensembl), SCN5A geninde yaklaşık 1400 adet varyant olduğu raporlanmıştır (370 patojenik, 602 iyi huylu ve 420 adet anlamlılığı belli olmayan varyant). Bu varyantların %30'dan fazlasının klinik önemi bilinmemektedir. SCN5A varyantları fonksiyon kazanımı veya kaybı çeşidinde olabilir (59, 60). SCN5A geninde meydana gelen mutasyonlar, bir çok atriyal ve ventriküler aritmi hastalığıyla ilişkilendirilmiştir (38). Atriyal aritmilerden en sık gözlenen hastalık atriyumun hızlı ve düzensiz atımı olan atriyal fibrilasyondur (4). SNC5A mutasyonları ilişkili ventriküler aritmiler sonucu genç bireylerde ani ölüm riski gelişmektedir. SCN5A geninin en sık yol açtığı ventriküler aritmi hastalığı uzun QT sendromu-3 (UQTS-3)'tür. Bu hastalık EKG verisinde uzamış QT/QTc intervalinin eşlik ettiği, literatürde 18 çeşidi olduğu bilinen uzun QT sendromlarından

birisidir. Otozomal dominant geçişli olan UQTS-3, tüm UQTS hastalarının %5-10'unu oluşturur (1). şimdiye kadar UQTS-3 ile ilişkilendirilmiş 300'den fazla *SCN5A* varyantı tespit edilmiştir.

Diğer bir *SCN5A* ilişkili ventriküler aritmi hastalığı Brugada sendromudur. İlk olarak 1992 yılında Pedro Brugada ve Josep Brugada kardeşler tarafından tanımlanmıştır (61). Kalp içinde elektriksel uyarıların iletilmesi ile ilişkili, ani kalp ölümlerine yol açan bir hastalıktır. Brugada sendromu fonksiyon kaybı mutasyonlarından kaynaklanır ve bu sendromla ilişkili en az 20 gen daha tanımlanmıştır (1). İlginç olarak bazı *SCN5A* mutasyonu olan hastalarda, aynı anda UQTS-3 ve Brugada sendromu ile ilişkili çok çeşitli ve karışık fenotipler gözlenmiştir ki bu kişilerin hastalık tanısına overlap sendromu adı verilmektedir (38).

4.3.3 *CASQ2* geni

Kardiyak kalsekuestrin proteinini kodlayan *Casq2* geni farede 12 ekzonlu bir gendir ve 1p13.1 kromozomda lokalizedir. *Casq2* proteini kardiyomiyosit hücrelerinde, Ca^{2+} deposu ve salınım merkezi olan SR'nin içerisinde bulunur (62, 63). Bu protein SR membranındaki ryanodin reseptörü RyR2 ve diğer bağlantı proteinleri ile bağlanarak kompleks bir yapı oluşturur (şekil 4.10) (64). SR içindeki lüminal Ca^{2+} iyonları *Casq2* proteinlerine düşük afinite fakat yüksek kapasite ile bağlanır. Bu bağlanmanın sebebi, diyastol esnasında Ca^{2+} presipitasyonunu önlemek ve iyonik Ca^{2+} konsantrasyonunu düşürmektir. *Casq2* proteini, her molekülü başına 40-50 Ca^{2+} iyonu bağlar. *Casq2* proteininin en kritik görevi SR'den Ca^{2+} indüklü Ca^{2+} iyon salınımında regülatör protein olmasıdır (65, 66).



Şekil 4.10 Sarkoplazmik retikulum içerisinde yer alan kalsekuestrin proteini. Casq2: Calsequestrin 2. RyR2: Kardiyak ryanodin reseptörü. Ca^{2+} : Kalsiyum. SR: Sarkoplazmik retikulum. SERCA: SR Ca^{2+} -ATPaz. PLN: Fosfolamban (Phospholamban).

4.3.4 CASQ2 gen mutasyonları ilişkili ventriküler taşikardiler

CASQ2 mutasyonları kaynaklı hastalıklar; katekolaminerjik polimorfik ventriküler taşikardi (CPVT), stres kaynaklı polimorfik ventriküler taşikardi, aritmojenik sağ ventriküler displazi, stres koşulları altındaki aritmojenik sağ ventriküler kardiyomiyopatiler veya istirahat halindeyken polimorfik ventriküler taşikardilerdir (67). CASQ2 geni mutasyonu sonucu en sık CPVT hastalığı görülmektedir (68, 69). CPVT, adrenerjik olarak düzenlenen polimorfik ventriküler taşiaritmi ile karakterize kalıtsal aritmojenik bir bozukluktur (7). Popülasyona göre insidansı 1:5.000–1:10.000 arası değişmektedir (70). CPVT komplikasyonları sonucunda mortalite oranı %30-50 olarak belirlenmiştir ve hastaların %80'i 40 yaşına kadar tedavi edilmezse senkop, ventriküler taşikardi veya ventriküler fibrilasyon gibi semptomları gelişeceği bilinmektedir (7, 64).

2019 yılında, altı farklı CPVT hastalık geni daha tanımlanmıştır. CPVT patogenezinin sebep olan diğer genler; *RYR2*, *TRDN*, *CALM1*, *CALM2*, *CALM3* olarak belirlenmiştir. CPVT hastalık patogenezinde yer alan tüm genler, kardiyomiyositlerin uyarılma-kasılma eşleşmesi (excitation-contraction coupling) sırasında SR'den Ca^{2+} salınımının düzenlenmesinde doğrudan yer alan proteinleri kodlar (71).

CPVT hastalığının iki formu vardır; otozomal dominant formu *RYR2* gen mutasyonları sonucu CPVT1, resesif formu ise kardiyak izoform CASQ2 geni homozigot mutasyonları sonucu CPVT2 görülür (64). CASQ2 ilişkili CPVT hastalığı,

RYR2 ilişkili CPVT'den daha az görülmesine rağmen klinik tablosu daha ağır seyreder (72). *RYR2* mutasyonları (CPVT1) fonksiyon kazanımı mutasyonlar sınıfına dahil olurken *Casq2* mutasyonları (CPVT2) fonksiyon kaybı mutasyonlar sınıfında yer alır (70). *Casq2* mutasyonları SR'den diyastolik kalsiyum sızıntısına sebep olur ve bu durum, prematüre atım ve ölümcül polimorfik ventriküler taşikardiyi tetikleyen sitozolik Ca^{2+} artışına sebep olur (73). CPVT aritmilerinin yol açtığı SR'den stabil olmayan Ca^{2+} salınımı, EKG verilerinde delayed afterdepolarization (DAD) durumu ile kendini gösterir (74). Bu hastalığa sahip bireylerde dinlenme anında taşikardi görülmezken stres veya egzersiz anında bu gen eksikliği taşikardi şeklinde fenotipe yansıtır ve senkop/ani ölüm gibi ciddi tablolara yol açar (53, 75). *Casq2* geninin çıkartılmasıyla oluşturulan *Casq2*^{-/-} transgenik fare modellerinde, kalsekuestrin proteininin sentezlenmemesi Ca^{2+} iyonlarının SR'den devamlı halde sitoplazmaya sızmasına sebep olmaktadır. Ca^{2+} iyonlarındaki bu kontrolsüzlük durumu kardiyomiyositlerde normalin dışında ritim ve frekansta kasılmalara sebep olur ve böylece taşikardik durumlar ortaya çıkar (8).

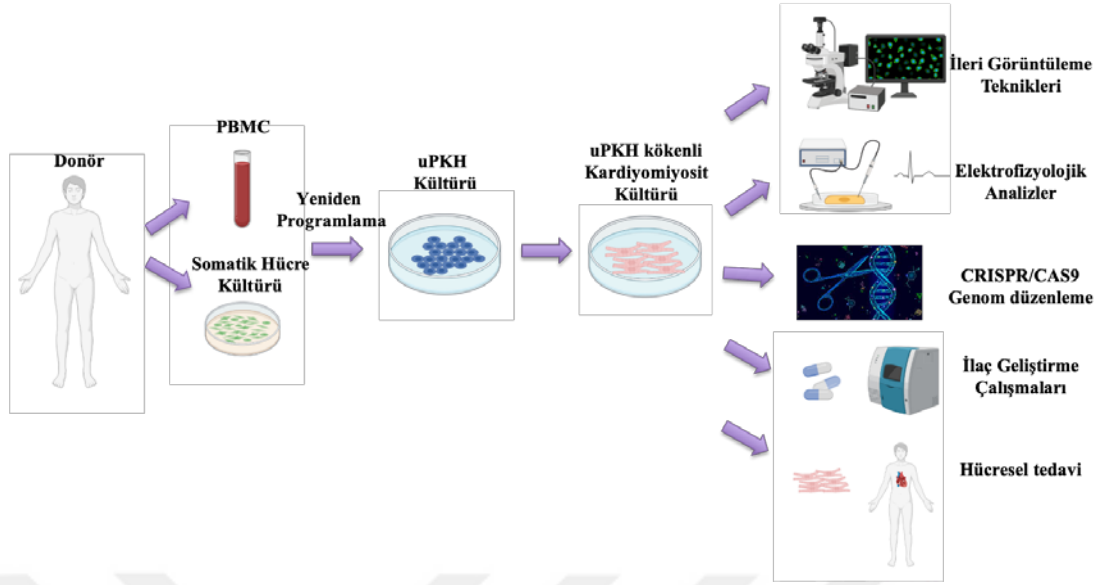
4.4 Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre (uPKH) Üretilmesi ve Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması

Embriyonik kök hücreye spesifik transkripsiyon faktörlerini (*OCT4*, *KLF4*, *SOX2* ve *C-MYC*) içeren bir vektör yardımıyla, literatürde ilk defa 2006 yılında fare ve 2007 yılında insan somatik hücrelerinin yeniden programlanması ile uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH, iPSC, induced pluripotent stem cell) teknolojisi doğmuştur (17, 76). Yamanaka ve arkadaşlarının (17, 76) yürüttüğü uPKH farklılaşması genoma entegre olan retrovirüsle yapılmış olup bu yöntem genomda istenmeyen sonuçlara yol açan değişikliklere sebep olmuştur. Literatürde, genoma entegre olan ve olmayan yöntemlerle oluşturulan uPKH hatlarının transkripsiyonel gen analizleri karşılaştırıldığında, entegre olmayan metodlarla oluşturulan uPKH hattının embriyonik kök hücrelere, entegre olan metodlara kıyasla genetik ve epigenetik açıdan daha yakın olduğu belirtilmiştir (77). Ayrıca, ilk çalışmalarda fibroblast hücreleri somatik hücre kaynağı olarak kullanılırken artık uPKH eldesinde venöz kandan izole

edilen periferik mononükleer hücreler (PBMC) yüksek proliferasyon özelliği ve kolay temin edilmesi yönünden tercih edilmektedir (78).

Kişiselleştirilmiş tıp ve *in vitro* hastalık modelleri ile tedavi geliştirmeye yönelik araştırmalarda kalıtsal özellikteki hasta kökenli uPKH'leri büyük katkı sağlamaktadır. Bu teknoloji sayesinde, daha önce kültürü yapılması mümkün olmayan *in vitro* kardiyak hastalık modelleri oluşturulabilmektedir (79). Bu hastalık modellemelerinde kullanılan kardiyomiyosit kültürleri için çeşitli uPKH-temelli farklılaştırma protokolleri mevcuttur. Bu protokoller, kardiyak spesifik transkripsiyon faktörlerinin (*NKX*, *GATA*, *T-box* ve *IRX4* gibi) doğrudan genom entegrasyonu veya genom entegre olmadan kardiyak farklılaşmada görevli sinyal yollarının manipüle edilmesi şeklinde ikiye ayrılmaktadır (80, 81). TGF- β /BMP (Transforming growth factor-beta/bone morphogenic protein), WNT ve Notch gibi kardiyak gelişim aşamasında görevli sinyal yollarının regülasyonundan faydalanan protokoller en yüksek verimliliği sağlamaktadır (16, 82–84).

Literatürde şimdiye kadar uPKH-temelli kardiyomiyositler ile UQTS, CPVT, aritmojenik sağ ventrikül displazisi, Barth sendromu, Timothy sendromu, LEOPARD sendromu, ailesel dilate kardiyomiyopati, ailesel hipertrofik kardiyomiyopati, aldehit dehidrojenaz genetik polimorfizmi ve kemoterapiye bağlı kardiyotoksisite gibi kalp hastalıkları *in vitro* modellenmiştir. Bu sayede, uPKH-kökenli kardiyomiyositler kullanılarak ileri düzey elektrofizyolojik analizler, ilaç keşifleri ve mutasyon bazlı ilaç geliştirme, toksisite çalışmaları ve kişiye özel hücresel tedavi çalışmaları etkin bir şekilde yapılabilmektedir (Şekil 4.11) (75, 81, 85, 86).



Şekil 4.11 İnsan uPKH üretimi ve teknolojisi kullanım alanları. PBMC: Periferal kan mononükleer hücreler. UPKH: Uyarılmış pluripotent kök hücre. CRISPR/CAS9: Kümüleşmiş düzenli kısa palindromik tekrar dizileri. CAS9: CRISPR-ilişkili protein 9.

4.5 Kardiyomiyositlerde Fonksiyonel Karakterizasyonlar

EKG gibi invazif yöntemlerin uygulanmasının mümkün olmadığı *in vitro* kültür ortamlarında yapılan elektrofizyolojik ölçümler, EKG benzeri veriler sunarak atım profillerini incelemeye olanak sağlamaktadır. Bu sebeple, kalp atım sayısı ve ritmini gösterebilecek bazı fonksiyonel kasılma analiz teknikleri kardiyak kültürlerin analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (85, 87, 88). Kardiyomiyosit kültürleri için en sık kullanılan fonksiyonel ölçüm metotları; membran veya alan potansiyellerini analiz eden yama kısıkaçı (Patch clamp), çoklu elektrod sistemi (MEA: multielectrode array), hücre içi Ca^{+2} görüntüleme ve piksel değişimine bağlı kasılma analizi (MUSCLEMOTION) yöntemleridir (85, 89, 90).

4.5.1 Hücre içi Ca^{+2} görüntüleme

Voltaj duyarlı Ca^{+2} kanallarının açılıp kapanması, kardiyak hücrelerin kasılması için gerekli depolarizasyon-repolarizasyon döngüsünün başlatılıp sürdürülmesinde görevlidir. Sitozolik Ca^{+2} iyonu kas kasılmasında eksitasyon-kontraksiyon eşleşmesi işleminde ikincil mesajcı olarak görev alır (91). Kasılma esnasında Ca^{+2} iyonunun

parlamalarının 1993 yılındaki keşfi sayesinde, hücre kasılırken sitozolik Ca^{+2} değişimlerini tespit etmeye yarayan hücre içi Ca^{+2} görüntüleme yöntemi geliştirilmiştir (87, 88). Hücre içi Ca^{+2} görüntüleme, kardiyak kültürlerin karakterizasyonunda, kardiyomiyositlerin kasılma ve iyon kanalları aktivasyonu gibi fizyolojik aktivitelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır (87, 92). Ca^{+2} görüntüleme metodunda, Ca^{+2} iyonuna bağlanan Rhod-2, Indo-1, Fura-2 veya Fluo-4-AM gibi kalsiyum değişimine duyarlı sentetik boyalar ve pluronik asit gibi boyanın yüklenmesini kolaylaştıran kimyasallardan faydalanılır (87, 88). Böylece, kardiyomiyositler kasılırken hücre içi Ca^{+2} artması ve azalması durumunda ortaya çıkan kalsiyum değişimleri floresan işaretli Ca^{+2} boyları sayesinde tespit edilmektedir.

4.5.2 Video temelli kasılma analizi MUSCLEMOTION

In vitro kardiyak kültürlerin aydınlık alan mikroskobu ile kaydedilen kasılma videolarından kardiyomiyosit kasılma paternlerini tespit edebilen MUSCLEMOTION isimli yöntem 2018 yılında literatüre kazandırılmıştır (89). Kardiyomiyositlere spesifik fonksiyonel kasılma analizi olarak çeşitli fonksiyonel çalışmalarda yerini alan bu yöntem ile farmakolojik ajanların, hedef moleküllerin veya iletişim kurduğu komşu hücrelerin kardiyomiyositler üzerindeki etkileri kısa zamanda kolayca incelenebilmektedir. Hücrelerin ışık mikroskobu altında kayıt edilen yüksek FPS (frame per second, saniye başına düşen kare sayısı) özellikli videolarındaki kasılmalar, ImageJ yazılımına kurulan MUSCLEMOTION isimli eklenti sayesinde piksel analizi yöntemi ile analiz edilmektedir. Grafiğe dökülen kasılma modelleri, aritmi varlığı, senkronize atım ve dakika başına atım (BPM: beats per minute) sayılarının analizini yapmaya olanak sağlamaktadır.

4.6 Kardiyak aritmi immünopatogenezi

Son yıllarda kalbin homeostazında ve kalp hastalıklarının gelişiminde yer alan immün sisteme ait hücresel ve moleküler faktörlerin araştırılmasıyla kardioimmünoloji alanı doğmuştur (5, 93). Kalbin hücrelerinin karakterizasyonu amaçlı yapılmış detaylı akım sitometrisi ve immünohistokimya kaynaklı bir çalışmada, kardiyomiyosit dışı hücrelerin %60'ının endotel hücreler, %5-10'unun

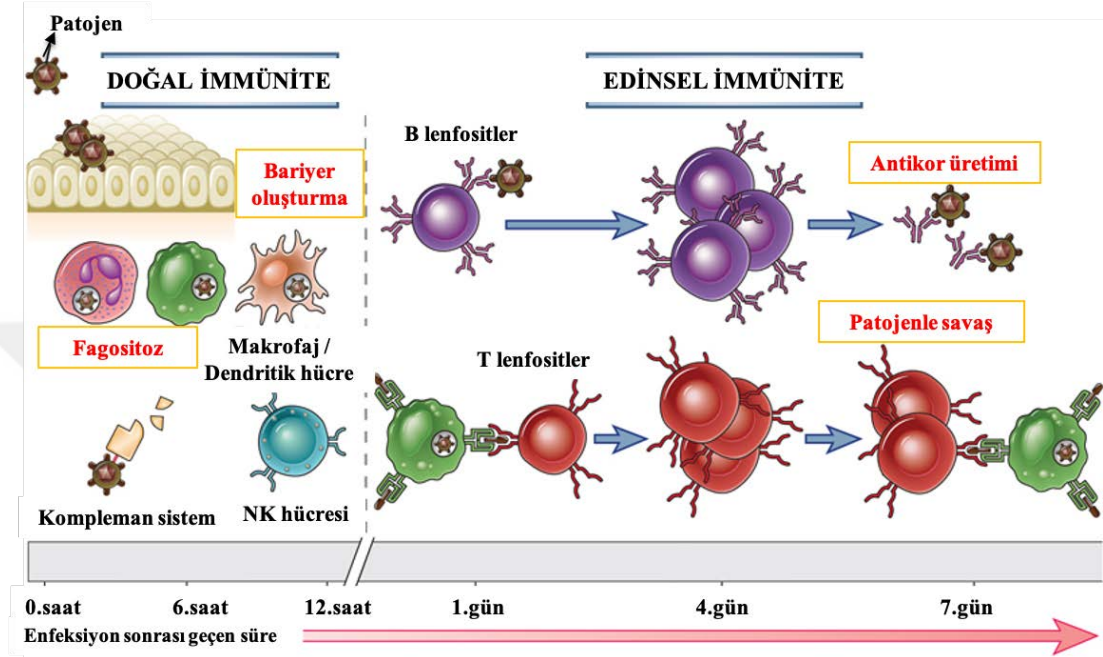
hematopoetik kök hücre kaynaklı hücreler ve %20'sinin kardiyak fibroblastlar olduğunu göstermiştir (15). Kalpte sağlıklı durumda yer aldığı tespit edilen hematopoetik kök hücre kaynaklı hücrelerden kardiyak immün hücreleri oluşur. Bunlar; mast hücreleri, dendritik hücreler ve makrofajlar olarak tanımlanmıştır. Kalpte bir hasar oluştuğunda ise bu hücre grubuna nötrofiller, T hücreleri ve B hücreleri de eklenir. Kalpte hasar durumunda tüm immün kardiyak hücre popülasyonlarının oran ve fenotiplerinde değişiklik olduğu gözlenmiştir (31, 94, 95).

Pro-inflamatuvar sitokinler ve kemokinler gibi immün sistem salgılarının kardiyak aritmilere sebep olduğu çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (96). Özellikle, lökosit sayısı, CRP (akut faz proteini), TNF- α (tümör nekroz faktör-alfa), IL-1 β (İnterlökin-1beta), IL-6, IL-2, IL-8 ve MCP-1 (monosit kemoatrakt protein-1) gibi faktörlerin, kardiyomiyositler üzerinde direkt (iyon kanalları üzerine etki yoluyla) ve indirekt (merkezi sinir sistemi üzerinden) olarak aksiyon potansiyeli süresini etkileyerek kardiyak aritmilere sebep olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda otoimmün kardiyak kanaloopatiler ile ilişkili parametreler de ritim bozuklukları ile ilişkilendirilmiştir (96–98). Bunun yanında, kardiyak aritmiler kalp dokusunun bakteriyal invazyonu ile ortaya çıkan inflamatuvar kalp hastalıkları (miyokardit, endokardit gibi) ile tetiklenebilmektedir (5). Romatoid artrit, sistemik lupus ve hipertiroidizm gibi kardiyak kökenli olmayan bazı hastalıklarda da, EKG ölçümlerinde QT intervali uzaması gözlenmiştir. Bu uzamanın sebebi araştırıldığı kardiyak aksiyon potansiyeli süresindeki değişimlerin sözkonusu pro-inflamatuvar sitokinler ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (5, 98).

4.7 İmmün Sistem ve Hücreleri

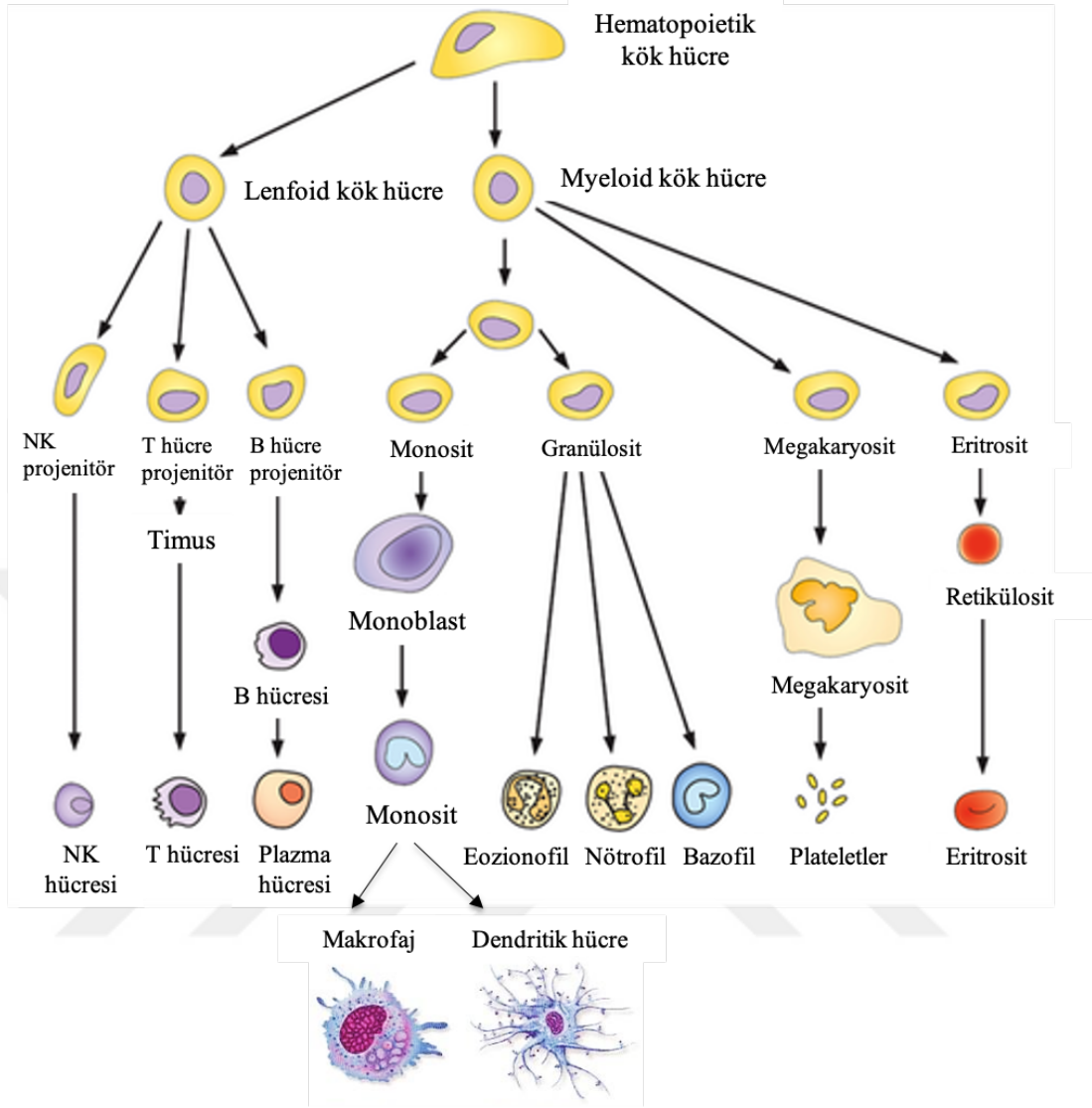
İmmün sistem, fonksiyonel olarak 1- spesifik olmayan doğal ve 2- edinsel (adaptif) immün sistem şeklinde iki ana bölümden oluşmaktadır. Doğal immün sistem, enfeksiyonlara karşı erken savunma sistemi olarak da tanımlanabilmekte, ölü dokuların temizlenmesi (fagositoz) ve onarım sürecinin başlamasında görev almaktadır (Şekil 4.12). Doğal immün sistemin elemanları; mast hücreleri, dendritik hücreler, NK (Natural Killer) hücreleri, nötrofiller, monositler ve makrofajlardır. Doğal immün sistemden sonra devreye edinsel immünite girer ve elemanları;

enfeksiyonlarla savaşan T hücreleri ve antikor salgılayan B hücreleridir (Şekil 4.12). Edinsel immünitenin oluşabilmesi doğal immün sistemin cevabından daha uzun bir süre alabileceğinden, dokulara gelen ilk saldırıları önlemede etkin değildir (99, 100).



Şekil 4.12 Doğal ve edinsel immün sistemi. Enfeksiyon sonrası geçen süreye bağlı olarak önce doğal immünite sonrasında edinsel immünitenin elemanları ve görevlerini betimleyen şekil. NK: Natural killer. (Abbas 2021’den uyarlanmıştır).

Edinsel immünite elemanları lenfoid öncül hücrelerden farklılaşırken, doğal immünite elemanları miyeloid öncül hücrelerden farklılaşırlar (Şekil 4.13). Bu iki öncül hücre grubu, oksijen taşıyan eritrositler, hasarlı dokularda kan pıhtılaşmasını tetikleyen trombositler ve bağışıklık sisteminin lenfositleri de dahil olmak üzere kandaki tüm hücresel elementleri oluşturan kemik iliğindeki hematopoietik kök hücrelerden farklılaşır (99–101). Tüm immün sistem hücreleri aktif bir şekilde kan dolaşımında veya immün organlarda yer alırken, monositler düzenli olarak dokulara geçerek makrofajları ve dendritik hücreleri oluşturur (Şekil 4.13) (99, 100).



Şekil 4.13 Hematopoietik kök hücrelerden immün sistem hücrelerinin farklılaşması. NK: Natural Killer.

4.7.1 Makrofajlar

Makrofajlar, fizyolojik olarak çoğu dokuda yer aldığı tanımlanan, doğal ve adaptif immün yanıtta görevli, profesyonel antijen sunan fagositik hücrelerdir. Dokuya özgü makrofajların dokunun homeostazında ve hasar anında çöpçü hücreler olarak ölü hücre ve moleküllerin temizlenmesinde görev aldıkları bilinmektedir. Makrofajlar, uygun mikroçevre ve faktörler varlığında, dolaşımda bulunan lökositlerin yaklaşık %10'unu oluşturan monositlerden farklılaşırlar (Şekil 4.13). Monositler endotellerden dokuya geçerek ve matrikse tutunarak farklılaşan fizyolojik olarak vücudun tamamına

yayılan bir immün sistem hücre grubudur (102). İnsanlarda, dolaşımdaki monositlerin %90'ı, bir tür patojen tanıma reseptörü olan Fc gama reseptörü (FcγIII) ve klasik bir monosit yüzey belirteci olan CD14'ü ifade eder. Farelerde, monosit popülasyonu aynı zamanda yüksek seviyelerde Ly6C yüzey belirtecini de ifade eder (103). İnsandaki monositler üç ana popülasyon olarak kanda dolaşır; klasik tipte pro-inflamatuvar CD14⁺⁺CD16⁻ monositler kanda %85-90 oranında bulunur ve dolaşımdaki ömürleri 1,6 gündür. Geri kalan %10-15'lik popülasyonda ise intermediate/ara CD14⁺⁺CD16⁺ monositler ve klasik olmayan CD14⁺CD16⁺ monositler vardır (10, 103). Bu iki tip monosit grubunun dolaşımdaki ömürleri yaklaşık 4-7 gündür (104). Klasik monosit grubu fagositoz ve inflamasyon durumlarında etkinken, ara grup inflamatuvar cevaplara katılır, klasik olmayan monositler ise antiviral cevaplarda rol alır. Dokuya göç ederek doku makrofajlarına dönüşen monositlerde CD14 gen ifadesi de dereceli olarak düşmektedir (103).

Dokuya yerleşik makrofajların kan dolaşımındaki monositlerden farklılaşmasının yanı sıra lokal proliferasyon ile çoğaldığı da gösterilmiştir. Makrofajların kendilerini yenilemesi, bulunduğu dokuda kendisi veya fibroblastlar gibi ilişkide olduğu yardımcı hücre tipleri tarafından üretilen makrofaj-koloni uyarıcı faktör (M-CSF) ve bu büyüme faktörü ile aynı reseptör üzerinde etki eden interlökin 34 (IL-34) adı verilen bir sitokine bağlıdır (95).

Makrofajların varlığı birçok dokuda tanımlanmıştır ve genellikle organların bağ dokularına yerleşirler. Makrofajlar, gastrointestinal sistemin ve akciğer bronşlarının submukozal tabakasında, akciğer interstisyumunda (alveollerin çevresindeki doku ve hücreler arası boşluklar), alveollerin içinde, karaciğerdeki kan damarları boyunca ve dalağın tamamında bulunurlar. Dokuda yerleşik bulunan ve dokunun homeostazına katkıda bulunan makrofajlara tarihsel olarak farklı isimler verilmiştir (105). Karaciğer makrofajlarına Kuppfer hücresi, akciğer makrofajlarına alveolar makrofajlar, merkezi sinir sistemi makrofajlarına mikroglia, epidermis tabakasında bulunan makrofajlara Langerhans hücresi, kalpte bulunan makrofajlara ise kardiyak makrofajlar denmektedir (106–108).

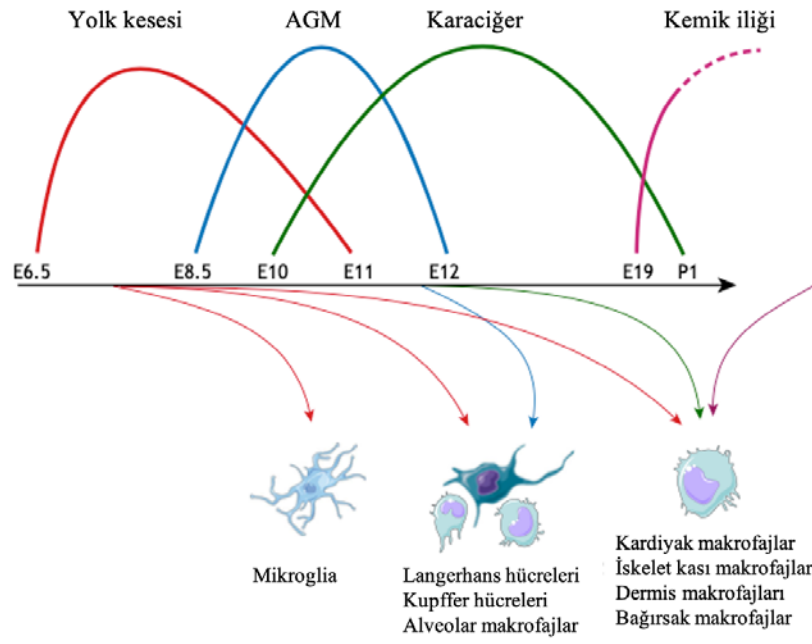
4.7.2 Makrofajların gelişimsel süreci

Makrofajların başlıca fagositik özellikleri olmak üzere fonksiyonları, ilk defa 1908 yılında Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel ödülü almış bilim insanı Elie Metchnikoff tarafından tanımlanmıştır (101). Gelişimsel aşamada oluşan ve yetişkin vücudunda yerleşik olarak bulunan üç makrofaj grubu tespit edilmiştir. Bunlar;

1. Yolk kesesi kökenli dokuya yerleşik makrofajlar,
2. Fetal karaciğer kökenli dokuya yerleşik makrofajlar ve
3. Kemik iliğinden türemiş monosit kökenli makrofajlardır (101, 109–111).

Farelerde yapılan gelişimsel çalışmalarda, embriyonik dönemin 6.5 ile 11. günler arası (E6.5-11) erken embriyogenez aşamasında, 1. tip yolk kesesi kökenli dokuya yerleşik makrofajlar, primitif (ilkel) hematopoez ile ekstra-embriyonik yolk kesesinde oluşur (Şekil 4.14). Bu tip makrofajlar, o dönemde embriyoda bulunan hematopoetik kök hücrelerden farklılaşan mikrogliya, Langerhans hücreleri ve kardiyak makrofajlardır. Olgunlaşmamış hematopoetik kök hücreler, E8.5-12 arasında aorta-gonad-mezonefros (AGM)’den meydana gelerek Kupffer hücrelerini ve alveolar makrofajları meydana getirir (Şekil 4.14). Tüm immün hücreler E10-19/P1 (doğum) zamanında üretilmeye başlanır ve böylece iskelet kası, dermis ve bağırsak gibi sistemlere 2. tip fetal karaciğer kökenli doku makrofajları yerleşir. Doğumdan hemen sonra kemik iliğinde hematopoez başlar, monosit hücreleri oluşur ve kan dolaşımına geçer (105). Bu monositler sonrasında dokuya geçerek 3. tip kemik iliğinden türemiş monosit kökenli makrofajları oluşturur. Doğumdan sonra E19-P1 zamanında fetal karaciğer hematopoietik kök hücreler, kemik iliğine göç ederek tüm kan hücrelerine farklılaşacak olgun hematopoietik kök hücrelere dönüşürler, bu sürece nihai hematopoez denir (Şekil 4.14) (101).

Gelişimsel süreçte doku makrofajlarının ilk olarak yolk kesesinden köken aldığı, *CX3CR1* geninin yeşil floresan protein (GFP) ile işaretlendiği (*Cx3cr1^{GFP/+}*) transgenik sistemlerde gösterilmiştir (112, 113). Gelişimin tüm süreçlerinde görülen hematopoez dalgalarında makrofaj öncül hücreler üretilmeye devam eder. Bu hücreler, organlara gönderilerek organizmanın hayatı boyunca hemostatik görevlerine yardımcı olacak bölgesel ve doku spesifik makrofaj popülasyonunu oluşturur (101, 114).



Şekil 4.14 Dokuya yerleşik makrofajların farede gelişim sürecinde hematopoez dalgaları. AGM: aorta-gonad-mezonefros, E: Embriyonik gün. (Theret 2019'dan uyarlanmıştır).

4.7.3 Makrofajların görevleri

Makrofajların kökenleri farketmeksizin tüm doku makrofajları, sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri gibi immüno-regülatör biyoaktif faktörleri salgılar (115). Doku makrofajlarının immün sistem olaylarını regüle etme rolünün yanı sıra doku homeostazında yer alan çeşitli görevleri de bulunmaktadır. Örneğin; dokuda elektrolit dengesi ve demir geri dönüşümünü etkileyerek termogenezi düzenlemesi gibi immün sistem dışı rolleri vardır (116). Diğer bir ilginç görevi, dokudaki hücreler arasında gerçekleşen organel transportunda görev almasıdır (117). Kalpte miyokardiyum tabakasında kardiyomiyosit hücreleri arasında, kapakçıklarda ve kalbin bağ dokusunda yer aldığı bilinen kardiyak makrofajların AV nodda yoğunlukla bulunarak kalbin elektrofizyolojik regülasyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (118, 119).

Makrofajlar dokudaki hastalık durumuna göre veya hayati fonksiyonların sürdürülmesi aşamasında çeşitli fenotipik belirteçleri membranlarında ifade etmektedir. İnsan ve fare makrofajı için birçok yüzey belirteci tanımlanmıştır. Bunlar; CD68, CD45, F4/80, CD11b, CD64, MERTK, MAC-3, CD11c ve CD115

proteinleridir (120). M0 naiv makrofajların başta olmak üzere tüm farklılaşmış makrofaj hücrelerinde ortak bulunan proteinlerden biri CD68'dir. CD68 endozomal/lizozomal kompartman ile ilişkili yüksek oranda glikozillenmiş tip 1 transmembran glikoproteindir. Diğer bir adı LAMP-4 olup LAMP protein ailesinin beş üyesinden biridir. Diğerleri, LAMP-1, LAMP-2, dendritik hücre (DC)-LAMP (CD208), ve beyin/dendritik hücre-ilişkili (BAD)-LAMP'dir (LAMP-5) (121). CD68 proteini çoğunlukla endozomal/lizozomal bölgede yer alır fakat hızlıca hücre membranına göç edebilir (121, 122).

Literatürde sıkça kullanılan bir diğer makrofaj belirteci F4/80 proteini, *ADGRE1* geni tarafından kodlanan transmembran bir proteindir. F4/80 ekspresyonu heterojendir ve inflamatuvar olaylar sırasında artabilir. F4/80'in ekspresyonu, *in vivo* erken miyeloid gelişim sırasında başlar ve *in vitro* olarak M-CSF ile uyarılan kemik iliği hücrelerinde görülür. F4/80 proteininin, Kupffer hücreleri, Langerhans hücreleri, mikroglialar, bağırsak lamina propriası, periton boşluğu, akciğer, timus, kemik iliği stroması ve dalağın kırmızı bölgesinde bulunan makrofajlar dahil olmak üzere çok çeşitli olgun doku makrofajlarında eksprese edildiği sıklıkla raporlanmaktadır (123).

Makrofajlar, sağlıklı durumda/homeostazdaki çoğu dokuda bulunan majör fagosit popülasyonudur. Makrofajlar, patojenlerin yüzey molekülleri ile konağın molekülleri arasında ayırım yapabilen hücre yüzeyi reseptörleri aracılığıyla patojenleri tanır. Bu fagositik reseptörler, C tipi lektin benzeri mannoz reseptörleri (çöpçü reseptörleri), kompleman reseptörleri ve Fc reseptörlerinin birkaç üyesini içerir. Makrofajlar ortamdaki yabancı bir molekülü, apoptotik hücre parçacıklarını ya da enfeksiyöz mikroorganizmaların olduğu alanlara göç ederek onları endositoz yolu ile hücrelerinin içine alarak fagosome eder. Fagositozdan sonra makrofajların hücre içlerinde, sindirmeye başlayacakları partikülleri içeren ve hücre membranından köken alan bir fagozom yapısı oluşur. Membranının partikülü içerecek şekilde kapanmasıyla fagozom, mikrotübüller boyunca hareket ederek önce endozomla sonra lizozomla birleşir ve böylece fagolizozom yapıları oluşur. Makrofajların yabancı moleküle doğru göç etmesi ve fagositoz kapasitesi, güçlü ve koordinasyon içeren bir aktin sitoskeleton organizasyonuna dayanır (124). Literatürde M1/M2 tiplerine yönlendirilmemiş M0 makrofaj kültürlerinin ve M2 fenotipi sergileyen makrofajların fagositoz

yeteneklerinin, M1 fenotipine yönlendirilen hücrelerden daha fazla olduğu gösterilmiştir (125).

Doku makrofajlarının diğer bir önemli görevi ise kemotaksidir. Dokuda oluşan enfeksiyon veya travma sırasında immün sistem hücrelerini bölgeye çağırmak üzere kemokin salgısı yaparlar. Böylece bölgeye ilk etapta nötrofiller olmak üzere birçok immün sistem hücresi toplanır. Dolaşımdan dokulara girmek için sinyal alan monositlerden de bölgede çevresel faktörlere bağlı olarak makrofajlara farklılaşırlar. Dokuya yerleşik olarak tanımlanmış makrofajlar daha çok inflamatuvar cevabın başlamasında ve bölgedeki saçılmış stres faktörlerini elimine etmede görevlidir (11). Kemokin (C-X3-C motif) reseptör-1 (CX3CR1), bir başka pan makrofaj belirteci olup fetal dönemde dokuya yerleşmiş makrofajlarda yüksek oranda ifade olması ile bir çok genetik reporter ve driver çalışmalarında kullanılmaktadır. CX3CR1, kemokin (C-X3-C motif) ligand-1 (CX3CL1/fraktalkin/nörotaktin)-spesifik kemokin reseptörüdür. CX3CL1, CX3C kemokin ailesinin tek üyesidir, transmembran bir proteindir (113, 126). CX3CR1 reseptörü genellikle monosit, makrofaj, mikrogliya, dendritik hücre, T hücresi, NK hücresi ve vasküler endotel hücreleri tarafından ifade edilir ve ekspresyonu dokuya özgüdür. CX3CL1-CX3CR1 ilişkisi, ligandın gradiyent konsantrasyonuna bağlı olarak immün hücrelerin kemotaksisini, yani bir bölgeye göçünü düzenler ve normal fizyolojik şartlarda doku homeostazında görevlidir. CX3CR1 ekspresyonu çevre şartlarına bağlı olarak pro- veya anti-inflamatuvar cevaba yönelik olarak ifade edilebilir (113).

4.7.4 Makrofaj alt tipleri

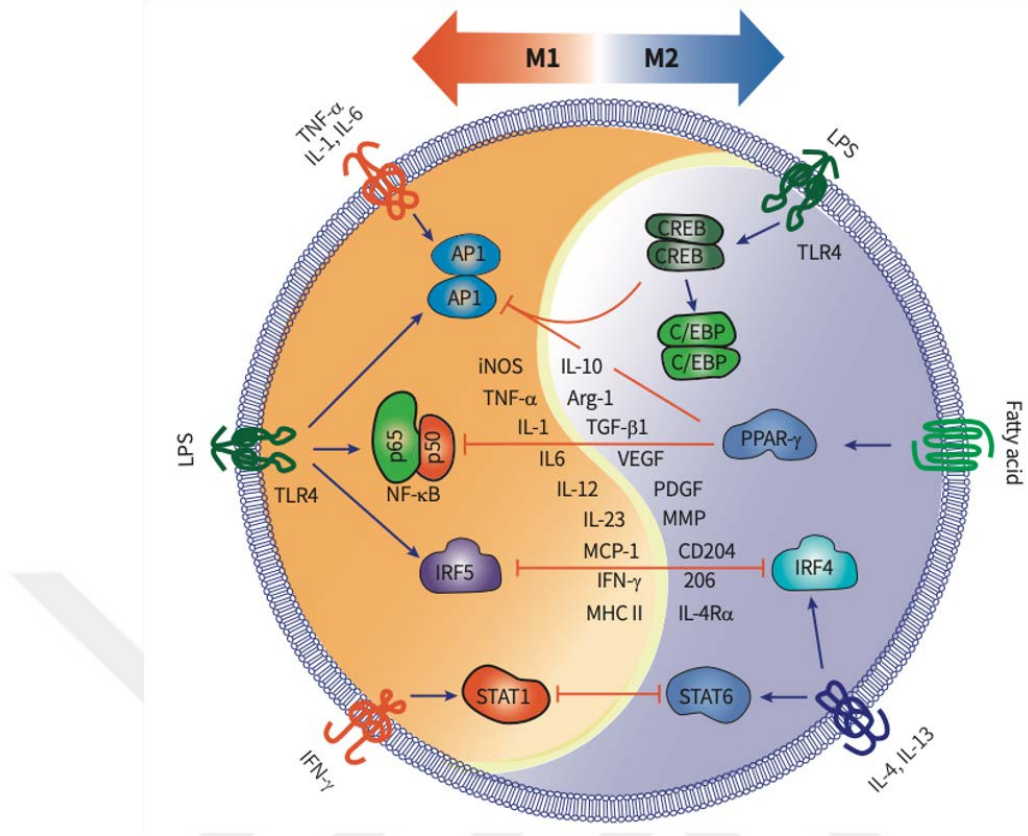
Hematopoetik kök hücrelerden köken alan CD14⁺ monositlerden dokuya kemotaksi hareketi ile göç ederek farklılaşan makrofajlar, herhangi bir hasar söz konusu değilken naiv veya M0 (resting) makrofaj fenotipi sergiler. Dokuda hasar veya inflamasyon olduğu durumda makrofajlar M1 fenotipine dönüşerek pro-inflamatuvar sitokin ve kemokinleri salgılayarak dokudaki immün yanıtı başlatır. Ayrıca, hasar durumunda dokuya göç eden monositler de pro-inflamatuvar M1 fenotipi sergiler ve dokuda M1 makrofajlara farklılaşırlar. Hasar sonrası iyileşme ve rejenerasyon süreçlerinde ise makrofajların, anti-inflamatuvar M2 makrofaj alt tipine dönüşerek

doku iyileşmesinde ve homeostazında rol aldığı ve çöpçü hücreler olarak ölü hücre parçacıkları ve moleküllerin temizlenmesinde görevli olduğu bilinmektedir (127–129). Makrofaj polaritesi olarak adlandırılan bu durumda, alt tiplerin birbirlerine dönüşümü geri dönüşümlü bir süreçtir. Ortamda stimüle edici bir faktör eksikliğinde veya inflamasyonun azalmaya başladığı kronik hasar sürecinde ise doku makrofajları tekrar naiv M0 fenotipine geri dönmektedir (116, 130).

Monositlerin ortamdaki büyüme faktörlerinin çeşidine ve yoğunluğuna göre sinyal olarak doku makrofajlarına dönüşmesinde görevli birçok sinyal yolağı tespit edilmiştir. TLR (Toll-benzeri reseptör) ve IFN (interferon) sinyallerine bağlı olarak aktive olan IRF/STAT sinyal yolağı, aktive olan STAT faktörlerinin çeşidine bağlı olarak makrofajların M1 veya M2 fenotipine dönüşümünü tetikleyen başlıca sinyal yolağıdır (131).

4.7.4.1 M1 makrofaj fenotipi

Ortamda interferon-gama (IFN- γ) ve bakteriyel hücre duvarı komponenti olan lipopolisakkarit (LPS) bulunduğu zaman makrofajlar, pro-inflamatuvar M1 fenotipine yönelip immün cevabı başlatır ve ortamdaki patojenleri veya yabancı molekülleri sindirerek parçalamak üzere bazı reaktif oksijen ürünleri üretir. Akut inflamasyonda dokuda bulunan makrofajların %95'i M1 fenotipine polarize olur (132). M1 polarizasyonunda görevli en temel yolak, LPS/TLR4 yolağı olup aynı zamanda STAT1- α/β proteinini aktive eder (133). M1 fenotipine dönüşümden sorumlu diğer faktörler ise G-protein coupled reseptör P2Y(2)R, NF- κ B/PI-3 kinaz yolağını aktive eden NOS2 (iNOS), SOCS3 ve IL-10 sitokininin üretimini baskılayan Aktivin A'dır (103). M1 makrofajlarda, NF- κ B ve MAPK sinyal yolaklarının aktivasyonu sayesinde TNF- α , IL-12, IL-6, CCL2, IL-1 β , ROS ve nitrojen ara ürünleri artışı gözlenir (Şekil 4.15) (134). M1 makrofaj fenotipinin klasik bir belirteci olan indüklenebilir nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi (iNOS), üç NOS çeşidinden biridir. İnflamatuvar olarak aktifleşen makrofaj, dendritik veya T hücrelerinden salgılanan nitrik oksit, patojenlerin elimine edilmesinde görev alan ve konağı koruyan sitotoksik bir ajandır (135).



Şekil 4.15 M1 ve M2 polarizasyonunda görevli sinyal yolları. Arg-1: Arjinaz 1. C/EBP: CCAAT-enhancer-binding protein. CREB: cAMP-responsive element-binding protein. IFN-γ: İnterferon-gama. IL: İnterlökin. iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz. IRF: İnterferon regülatör faktör. LPS: Lipopolisakkarit. LXRα: Liver X reseptör-alfa. MCP-1: Monosi kemoatraktan protein-1. MHC-II: Majör histokompatibilite kompleksi-II. MMP: Matriks metalloproteinaz. NF-κB: Nükleer faktör-kappa B. PDGF: Platelet kökenli büyüme faktörü. PPARγ: Peroksizom proliferate aktive edici reseptör γ. STAT: Sinyal Dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü. TGF-β: Transforme büyüme faktörü-beta. TLR4: Toll-benzeri reseptör 4. TNF-α: Tümör nekroz faktör-alfa. VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü. (Lee 2019'dan uyarlanmıştır).

4.7.4.2 M2 makrofaj fenotipi

M2 makrofajlar, inflamasyonu baskılama, durdurma, doku onarımı, iyileşme, dokunun yeniden modellenmesi süreçlerinde ve tümör gelişiminde rol oynar (Murray 2014). M2 makrofajlar yüksek miktarlarda çöpçü (scavenger), mannoz ve galaktoz tipte reseptör ifade etmeleri ile karakterizedir. Alternatif olarak aktive olan makrofaj sınıfı olan M2 makrofajlar, IL-4, IL-13, IL-10, glukokortikoid hormonların stimülasyonu ile polarize olurlar (130). IL-4 sitokinine bağlı olarak M2 makrofajlarda *STAT-6*, *STAT-1*, *SOCS2* ve *IRF-4* gen ifadeleri artarken, IL-10 sitokinine bağlı olarak ise *STAT-3*, *SOCS3*, *NF-κB*, *NFIL3* ve *SBNO2* transkripsiyon faktörlerinin ifadesi artar

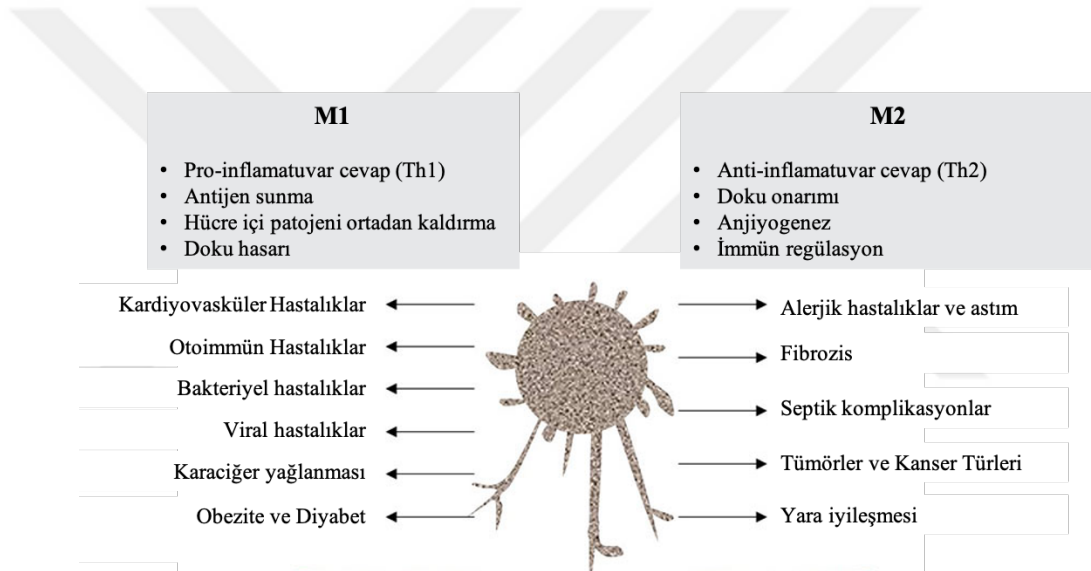
(103, 130, 134). Onarım esnasında M2 makrofajlar IL-10, resistin-like molecule- α (RELM α), kitinaz benzeri proteinler ve arjinaz 1 (ARG1) gibi immünregülatör faktörler ile onarımı düzenleyici matriks metalloproteinazlar (MMP) salgılar (Şekil 4.15).

Makrofaj mannoz reseptörü olan CD206 çoğunlukla doku makrofajları, olgunlaşmamış dendritik hücreler, endotel hücreler ve bazı spesifik lenfatik hücrelerde ifade olan C-tipi lektin ailesi mensubu transmembran bir glikoproteindir (136). Neredeyse tüm patojenik mikroorganizmaların hücre yüzeyleri mannoz içerikli yapılarla kaplı olduğu için makrofajlar büyük oranda CD206 reseptörünü membranlarında bulundurmaktadır. Bu reseptörün hücre dışı bölümü yüksek afinite ile mannoz ve fruktoz gibi şekerleri bağlayan N-terminal sistein-zengin bölgeler içerir. Mannoze reseptörü dolaşımdaki hipofiz hormonları ve istenmeyen yüksek mannoz *N*-bağlı glikoproteinleri bağlayarak ve öğüterek (scavenge) homeostatik bir etki gösterir (136). Makrofaj hücrelerine *in vitro* uygulanan IL-4, TGF- β ve granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) sitmülasyonunu takiben makrofajların M2 fenotipi sergileyerek CD206 mannoz reseptörü ifade ettiği, M-CSF, IL-10 ve deksametazon stimülasyonunu takiben ise M2 makrofajların CD163 haptoglobulin reseptörü ifade ettiği gözlenmiştir (137). CD206 mannoz reseptörünün diğer bir adı Mannoze reseptör C-tip 1 (MRC1) olup hem insan hem fare dokularında bu protein ismiyle ortak bir şekilde çalışlabilmektedir (136).

M2 makrofaj fenotipi kendi içerisinde M2a, M2b, M2c, M2d alt tiplerini içermektedir. IL-4 veya IL-13 tarafından aktive edilen M2a makrofajlar, IL-10, TGF- β , CCL17, CCL18 ve CCL22 faktörlerini yüksek oranda ifade etmekte ve endositik aktivitesini artırarak hücre büyümesini ve doku onarımını desteklemektedir. M2b makrofajlar, immün kompleks NLRP3 (Nucleotide-binding, LRR and PYD domains-containing protein 3), TLR ligandları ve IL-1 β tarafından aktive edilir, ve TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-10 gibi hem pro- hem de anti-inflamatuvar sitokinleri sentezler. İnaktif makrofajlar olarak da bilinen M2c makrofajlar, glukokortikoidler, IL-10 ve TGF- β tarafından indüklenir. Bu hücreler IL-10, TGF- β , CCL16 ve CCL18 salgılar ve apoptoz sırasında gerçekleşen fagositozda önemli roller oynarlar. TLR antagonistleri tarafından indüklenen M2d makrofajları, IL-10 ve vasküler endotelial büyüme faktörlerinin (VEGF) salınımına yol açar ve anjiyogenezi ve tümör gelişimini

destekler (138, 139). Buradan anlaşıldığı üzere, makrofajlar çevresel faktörlere cevaben dinamik olarak değişen, hızlı ve yüksek fenotipik plastisite gösteren fakat aynı zamanda tamamen farklılaşmış hücrelerdir.

Çeşitli hastalıklarda makrofaj polaritelerinin değiştiği gözlenmiştir. M1 ve M2 makrofaj polarizasyonunun hastalık çeşidine göre değişmesi makrofajların hastalık mekanizmalarında oynadığı rollerin değişkenlik göstermesi ile açıklanabilir. M1 tipi makrofajlar sadece bulaşıcı ve inflamatuvar hastalıklarla değil, MI, ateroskleroz ve insülin direnci gibi metabolik hastalıklarla da ilişkilidir. M2 makrofajlar ise alerjik hastalıklar, hasar sonrası fibrozis gelişimi ve kanserle ilgili mekanizmalarda sıklıkla gözlenmektedir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 Çeşitli hastalıklarda M1/M2 makrofaj polariteleri ve görevleri. Th: T hücre cevabı.

Literatürde son yıllarda bazı hastalıklı insan dokularında M4 tip makrofajlar tanımlanmıştır. Pro-inflamatuvar özellik gösteren M4 tip makrofajların oluşumu bir kemokin ligandı olan CXCL4 ile indüklenir (140) ve fagositik kapasite, ateroskleroz patofizyolojisinde köpük hücre (foam cell) oluşumuna artmış direnç, CD163 çöpçü reseptörü gen ifadesinin düşmesi ve MMP-2 / MMP-7 gen ifadelerinin artması ile M1 ve M2 tip makrofajlardan farklılık gösterdiği raporlanmıştır (103).

4.7.5 *İn vitro* makrofaj farklılaşması

Literatürde insanda dolaşımdaki çekirdekli hücrelerden izole edilen CD14⁺ monosit hücrelerinden naiv makrofajlara farklılaştırma protokollerinde, tüm kan hücre kültürleri için kullanılan RPMI-1640 bazal besiyerine 7 gün boyunca %10 oranında serum eklenmesi ortaktır. Kullanılan serum genellikle fetal sığır serumu (FBS) (141) veya fetal buzağı serumu (FCS) (142) olmakla birlikte insan AB kan grubuna sahip bireylerin serumları da kullanılmaktadır (143). Bu kültürle ayrıca M-CSF ve GM-CSF büyüme faktörleri de eklenir. Bu protokollerde M-CSF faktörü 10-50 ng/ml arasında, GM-CSF faktörü ise 1-25 ng/ml arasında kullanılmaktadır (125, 137, 144, 145). M-CSF (CSF-1), monosit-makrofajların proliferasyon, sağ kalım ve farklılaşma yollarlarında yer alan temel regülatör protein olup hücreyi makrofaj farklılaşması yönünde stimüle eder CSF-1R reseptörünün ligandıdır. Diğer koloni stimüle edici faktörler; GM-CSF (CSF-2) ve granülosit koloni stimüle edici faktördür (G-CSF, CSF32). M-CSF, monositlerde ifade olan bir tirozin kinaz reseptörü olan CSF1R'e (CD115) bağlanır (146). M-CSF'nin CSF-1R'ye bağlanması, fosfataz SHP-1, Src, PLC- γ , PI(3)K, Akt ve Erk gibi kinazların fosforilasyonuna sebep olarak reseptörün sitoplazmik kısmındaki tirozin rezidüleri reseptör dimerleri oluşturur ve hücre içi sinyal mekanizmasını başlatır (147). M-CSF-CSF-1R kompleksi daha sonra lizozomda degrade olur. CSF-1R aracılı sinyalizasyon, hücrenin sağ kalımı ve hücre döngüsünün S fazına girmesi için gereklidir. GM-CSF faktörü eozinofil ve nötrofillerin sağkalımı ve aktifleşmesinde, makrofaj ve dendritik hücre olgunlaşmasında görev alan bir büyüme faktörü olsa da M-CSF'nin tek görevi makrofaj hücrelerinin farklılaşması ve olgunlaşmasını stimüle etmek ve bölünmesini uyarmaktır, bu nedenle makrofaj spesifik bir büyüme faktörüdür (146). Farklılaşmanın sonunda M0 naiv makrofaj kültürlerine çeşitli kimyasallar ve/veya büyüme faktörleri eklenerek 1-2 gün boyunca isteğe bağlı olarak makrofajlar, M1-M2 polarizasyonuna indüklenmektedir (148). Bu faktörlerden en çok kullanılanlar; M1 polarizasyonu için LPS ve IFN- γ iken, M2 polarizasyonu için IL-4 ve IL-13 sitokinleridir (149).

İn vitro makrofaj farklılaştırma metodları kan dolaşımından saflaştırılan monositler ile sınırlı olmaksızın, uPKH'lerinin hematopoetik kök hücreye farklılaştırılmasının ardından makrofaj kültürü elde edilebilmektedir (150–152). Patogenezinde makrofajların görev aldığı çeşitli hastalıkların modellenmesinde,

bireye özgü uPKH-kökenli makrofajlardan faydalanılmaktadır. Örneğin; Dengue virus ve Zika virüs enfeksiyonlarındaki bireye özgü makrofajların virüs eliminasyonunda rolünü araştıran bir çalışmada, spesifik olarak insan embriyonik kök hücreden ve uPKH'lerinden farklılaştırılan makrofajlar kullanılmıştır (152). Ayrıca, IFN- γ reseptör 1 defekti kaynaklı mikobakteriyal hastalıklara yatkınlığı olan bir immün yetersizlik hastasından elde edilmiş uPKH'leri de makrofajlara farklılaştırılarak, bu reseptör eksikliğinde JAK/STAT sinyal yolağının mekanizması araştırılmıştır (151). Fakat literatürde uPKH'lerinden makrofaj farklılaştırma, immünolojik parametrelerin değerlendirilmesinin gerektiği çalışmalar tarafından tercih edilen bir yöntem değildir. Çünkü, monositler kemik iliği kökenli olmalarının avantajı ile kanda bol miktarda ve taze olarak bulunabilir. Ayrıca periferik kanın eldesi uPKH'lerinin üretilmesinden daha ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Bu sebeple, dolaşımdan saflaştırılan CD14⁺ monosit hücrelerinden makrofaj farklılaştırma metodu hastalıklar immünopatogenezinin araştırılmasında daha sık tercih edilmektedir.

4.8 Kardiyak Makrofajlar

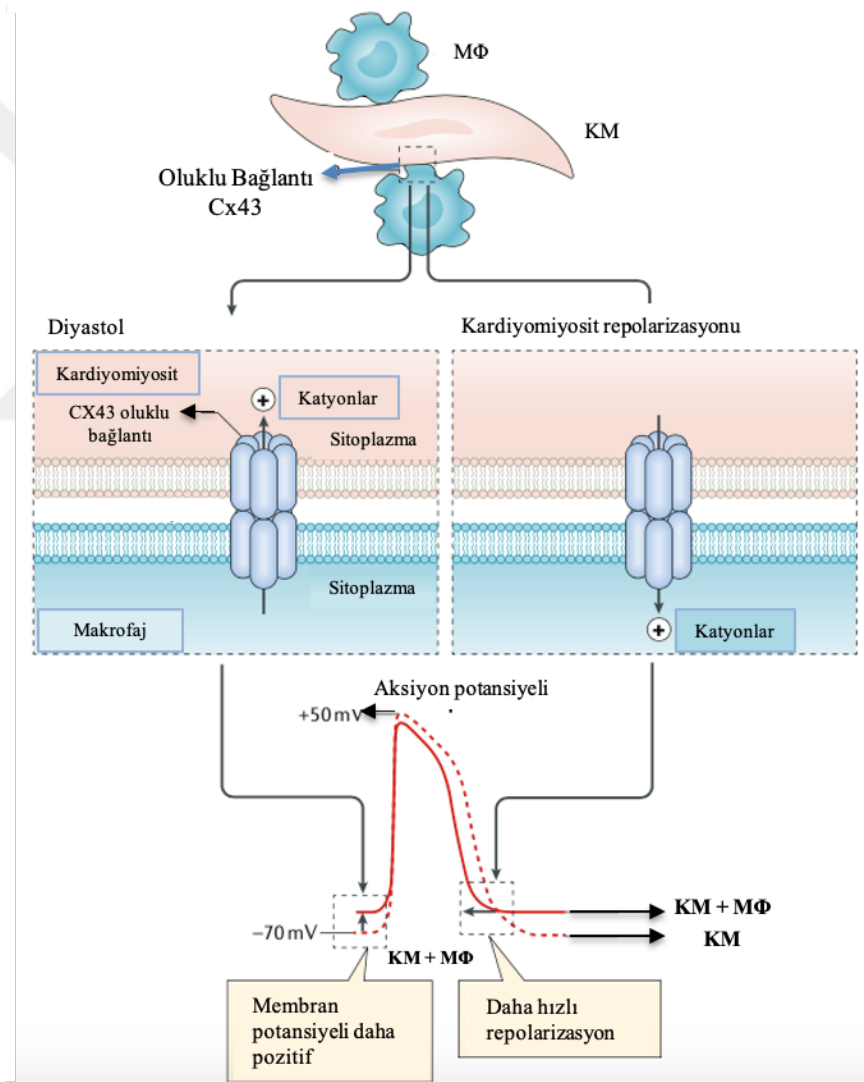
Kalbe özgü makrofajlar, Pinto ve arkadaşları tarafından ilk defa 2012 yılında *Cx3cr1^{GFP/+}* transgenik fareleri kullanıldığı bir çalışma ile histolojik ve fenotipik olarak tanımlanmıştır (14). Kalp dokularında *Cx3cr1* ifadesinin, immün sistem hücrelerinin gelişimsel sürecinde bahsedilen fetal dönemde yolk kesesinden köken alan hematopoetik kök hücrelerden oluşan doku makrofajlarına özgü olduğu bu çalışmalar ile bilinmekte ve kardiyak makrofajlar, *Cx3cr1^{GFP/+}* transgenik fare hatları kullanılarak araştırılmaktadır (113, 126, 153–155). Bu CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların miyokardiyumda kardiyomiyositlerle, perivasküler alanda ise kapiler endotel hücreleri ile temas kurduğu gösterilmiştir, bu özellik ile kardiyak makrofajların kalp homeostazında resiprokal parakrin sinyalizasyonunda görevli olduğunu kanıtlamıştır (14). Hem insan hem kemirgen kalbinde CD68⁺ CD11B⁺ CD163⁺ CX3CR1⁺ F4/80⁺ belirteçleri ile tanımlanan kardiyak makrofajların sağlıklı durumda ve kardiyak hastalıklardaki rolleri, histolojik ve anatomik çalışmalarda incelenmeye devam etmektedir (14, 119, 156–159). Bu çalışmalar içerisinde tüm kalbin hücresel kompozisyonunun tanımlanmasıyla, %7-10 arası olarak tespit edilen

lökosit grubu hücrelerinin çoğunluğunun kardiyak makrofajlar olduğu tespit edildi (15). Kalbe özgü makrofajların sağlıklı fare miyokardiyum tabakasında bulunan kardiyomiyosit olmayan hücre popülasyonunun %6-8 arasında olduğu bildirilmiştir (116, 160). Yetişkin fare miyokardiyumunda varlığı yüksek miktarda tespit edilen CX3CR1⁺ makrofajların gen ifade analizi sonucu, bu hücrelerin M2-spesifik *Cd206* ve *Cd163* genlerini de yüksek oranla ifade ettiklerinden M2 tip fenotipe yakın olduğu sonucuna varılmıştır (14, 161).

Kardiyak makrofajların lokalizasyonu homojen olmamakla birlikte embriyonik kökenli makrofajlar koroner damarlara yakinken, fetal monositlerden farklılaşarak türeyen makrofajlar endokardiyal trabeküle yakındır. Koroner arterler, kalp kapakçıkları ve perikardiyal sıvının bulunduğu perikardiyum ve epikardiyumun arasındaki bölgede makrofajların varlığı az da olsa gözlenmiştir (118). Genellikle kalbin iç ve dış katmanlarında (perikardiyum ve endokardiyum) ve endotel ilişkili yerlerde bulunan makrofajların monosit kökenli olarak dolaşımdan göç eden makrofajlar olduğu bilinmektedir. Monositlerin kan dolaşımı ile kalbe taşınmasının yanı sıra lenfatik yollarla da kalbe yerleşerek makrofajlara farklılaştığı gösterilmiştir (162).

Kardiyak makrofajların kardiyovasküler hastalıklardaki rolleri sıklıkla çalışılmaktadır. Fakat, bakteri enfeksiyonu kaynaklı perikardit, endokardit ve Lyme hastalığı gibi enfeksiyöz hastalıklarda kardiyak makrofajların rolleri, immün sisteme ait inflamatuvar ilişkili görevler ile sınırlıdır (163). Miyokardiyal enfarktüs (MI) ve iskemik kardiyomiyopati gibi steril enfeksiyon söz konusu iken kardiyak makrofajların immün sistem ilişkili görevleri M1-M2 makrofaj polaritesi sergileyerek dokunun hasar faktörlerinden arındırılarak onarımını başlatmaktır. Kardiyak makrofajların immün sistem görevleri dışında tanımlanan kalp homeostazına yardımcı rolleri kardiyak hastalıkların patogenezinin araştırılmasında önemlidir. Bu yardımcı roller arasında, postnatal dönemde kardiyak makrofajların sayısının hipoksi sonucu artmasıyla kardiyomiyosit proliferasyonunu tetiklemesi gösterilebilir (164). Kalbin koroner gelişimi ve olgunlaşması için ilkel embriyonik makrofajların gerekli olduğu bir çalışmada gösterilmiştir (111). Diğer ilginç bir rolü ise, defektli mitokondrilerin ekzofer veziküller ile kardiyomiyositlerden dışarı transportu üzerine kardiyak makrofajların bu hasarlı organelleri içeren vezikülleri fagosite etmesidir (165).

Kardiyak makrofajların 2017 yılında keşfedilen en sıra dışı görevi ise kardiyomiyositlerin depolarizasyonunu düzenleyerek kasılma fonksiyonlarını regüle etmesidir (9). İnsan ve fare kalplerindeki kardiyak makrofajların anatomik ve fonksiyonel etkilerinin araştırıldığı bu çalışmanın literatüre kattığı en şaşırtıcı bulgu, kardiyak makrofajların, AV nod kardiyomiyositleri ile bağlantı kurarak ritmik kasılmayı düzenleme özelliğidir. Makrofajlar ile kardiyomiyositler arasındaki CX43 oluklu bağlantı sayılarındaki artışın, kardiyak atım hızına korale olarak yansıdığı yapılan yama kıskacı analizleri ile gösterilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 Kardiyak makrofajların immünoelektrofizyolojik regülasyonunu özetleyen şekil. (Swirski ve Nahrendorf 2018’den uyarlanmıştır).

Aynı çalışmada, *Cx43* ve *Cd11b* genlerinde koşullu gen susturulması yapıldığında, 1. ve 2. derece AV blok durumu gözlenmiş, dolayısıyla kalbin kasılmalarının sekteye uğradığı gösterilmiştir. Bu AV blok durumunda elektriksel impuls atriyumlardan ventriküllere etkin bir şekilde geçemediği için farelerin EKG verisinde P dalgası ve QRS kompleksinde uyumsuzluklar gözlenmiştir. Kardiyak makrofajların kalp atımındaki doğrudan etkisinin ispatı için yapılan optogenetik metodu ile, rhodopsin kanallarının uyarıldığı *Cx3cr1^{wt/CreER}ChR2^{wt/fl}* transgenik fare kalplerinde AV nodda bulunan ve kardiyomiyositlere koneksinlerle bağlanan kardiyak makrofajların aktive olmasıyla kalbin kasılmasının anlamlı oranda hızlanması gözlenmiştir (Şekil 4.17) (9). Bu sebeple, kardiyak makrofajların dolayısıyla konneksin bağlantılarının azalmasının, kalbin ritmik atımının bozulmasında bir risk faktörü olduğunu göstermiştir. Bu çalışma literatürde ilk defa, yoğunlukla AV nodda lokalize kalbe özgü makrofajların kasılma ritmi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak, kardiyak makrofajlar, kardiyomiyositlerin kasılmaları için depolarizasyonu başlatıcı pozitif iyonların hücre içine girişini sağlayarak hücrelerin atımını düzenlemektedir. Bu önemli bulgular, makrofajların kardiyak aritmilere kalp atımının düzenlenmesinde koruyucu ve tedaviye destek olma potansiyelini ortaya çıkarmaktadır.

4.9 Literatürde Kardiyomiyosit ve Makrofaj Etkileşimini İnceleyen *In Vitro* Kokültür Çalışmaları

Kardiyomiyosit-makrofaj ilişkisini inceleyen *in vitro* kokültür çalışmaları son derece kısıtlıdır ve bu çalışmaların çoğu kemirgen kökenli makrofaj hücreleri ile yürütülmektedir (166–169). Yang ve arkadaşlarının (169) yürüttüğü çalışmada SARS-CoV-19 hastalığı, insan uPKH'lerinden üretilmiş kardiyomiyositler ve makrofajlar kullanılarak modellenmiştir. Fakat bu çalışmalarda makrofajların immün sistem rolleri araştırılmış, kardiyomiyositlerin elektrofizyolojik özellikleri incelenmemiştir (170). İnsan embriyonik kök hücre kökenli kardiyomiyositler ile fare kökenli makrofajların oluşturduğu bir kokültür çalışmasında ise atriyal fibrilasyon hastalık modeli oluşturulmuş ve bu hastalıktaki M2c fenotipli makrofajların kardiyomiyositlerin aritmik fenotipini düzelttiği gösterilmiştir (171, 172). Fakat

literatürde şimdiye kadar insan kökenli kardiyomiyosit ve makrofaj etkileşimini konjenital aritmi hastalık modelinde inceleyen *in vitro* bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Literatürde çeşitli organların patofizyolojisini araştıran hastalık modellerinde ve tek bir organın sahip olduğu farklı hücre tiplerinin birbirleri ile olan ilişkisinin araştırılmasında *in vitro* kokültür yönteminden faydalanılmaktadır (173–175). Kalbin *in vivo* olarak çalışılmasının zorluğu, kardiyak hücre çeşitlerinin *in vitro* kokültürlerde incelenilme avantajını doğurmuştur (160, 170, 176, 177). Kardiyak *in vitro* kokültür çalışmalarında sıklıkla kardiyomiyositler, endotel hücreler, kardiyak fibroblastlar ve mezenkimal kök hücrelerden faydalanılmıştır. Bununla birlikte kardiyak sistemlerde makrofajlar ile ilgili kokültür çalışmaları literatürde sınırlı olsa da makrofajların farklı hücre tipleri ile ilişkilerini inceleyen kokültür temelli araştırmalar mevcuttur (167-170).

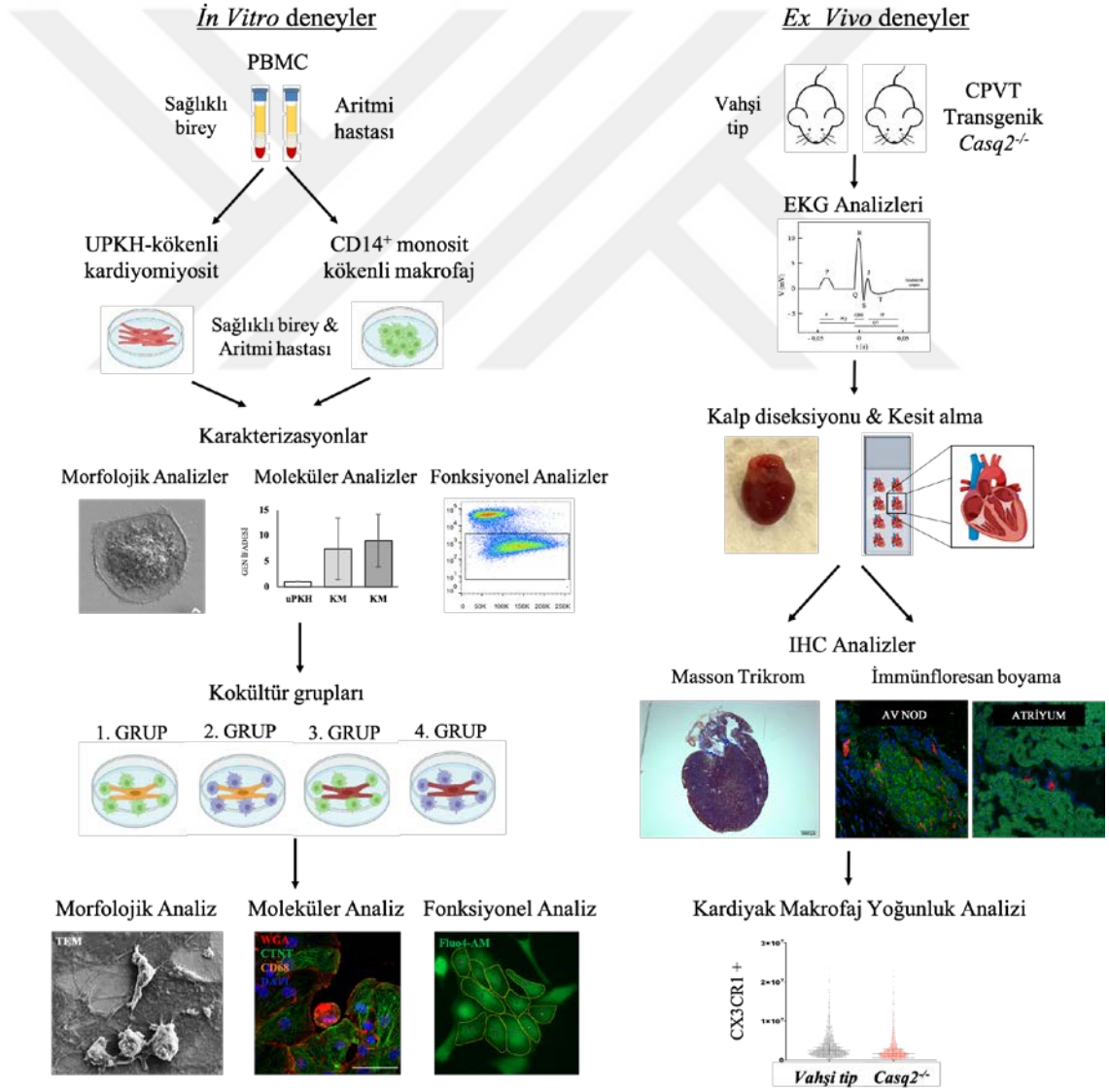
Makrofajların çoğunlukla fagositik özelliklerinden faydalanan kokültür çalışmalarında kullanılan hücre tipleri; epitel hücreler (178), kanser hücreleri (179), endotel hücreleri (180), nöronlar (181), osteoblastlar (182) ve mezenkimal kök hücrelerdir (173). Bu çalışmalarda kullanılan makrofajlar, RAW264.7 fare makrofaj hattı ve fare kemik iliği kökenli monositlerden farklılaşmış hücrelerdir (183, 184). RAW264.7 fare makrofaj hattı ile kardiyak hücreleri inceleyen kokültür çalışmaları, miyokardiyal hasar (185), miyokardiyal enfarktüs (MI) (186), MI sonrası aritmi (187) ve atriyal fibrilasyon (167) hastalıklarının immün mekanizmaları üzerine dizayn edilmiştir. İnsan kökenli kardiyak kokültür çalışmalarında ise sıklıkla THP-1 monosit hattı kökenli makrofajlar kullanılmaktadır ve bu çalışmalarda ateroskleroz (171) ve MI süreçleri incelenmiştir (188).

Son zamanlarda üç hücre tipi içeren kokültür çalışmaları da mevcut olup makrofajların, fare kardiyak fibroblast ve miyoblast hücreleri ile etkileşimi incelenmiştir (171, 172)

Tüm bu çalışmalar kalbin immün sistem hücresi dahil birçok hücre çeşidi barındırması sebebiyle kardiyak hücre ve hastalıkların moleküler immünopatogenezinin anlaşılmasında kokültürlerden faydalanılmasının güvenilir sonuçlar doğuracağını göstermiştir.

5. MATERYAL VE METOD

Bu tez çalışması, İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM) Deney Hayvanları Ünitesinde ve SABİTA bünyesindeki Moleküler Biyoloji ve Kök Hücre laboratuvarında Ocak 2018-Şubat 2022 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Etik kurul onayları, İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığınca 10840098-604.01.01.E.53607 sayısı ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığınca 10840098-604.01.01.E.54521 sayısı ile tedarik edilmiştir.



Şekil 5.1 Tez çalışmasının deney basamaklarının özeti.

5.1 Kullanılan Teknik Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH), uPKH kökenli kardiyomiyositler ve monosit kaynaklı makrofajların hücre kültürü ve analizleri için kullanılan moleküler tekniklerde kullanılan cihazlar ve yazılımlar Tablo 5.1’de listelenmiştir.

Tablo 5.1 Teknik Cihazlar, Yazılımlar ve Markaları

Cihaz/Yazılım	Marka
-20 °C dondurucu	Siemens
+4 °C buzdolabı	Thermo Scientific
Akım sitometri cihazı FACSymphony A1	BD Bioscience
Akım sitometrisi analiz yazılımı FlowJo v10.6.1	BD Bioscience
Axio Zoom V.16 mikroskop	Zeiss
Biopac Student Lab Versiyon 4.1	Bsl Analysis
Çalkalayıcı su banyosu	N-Biotek
Distile Su Cihazı 100 Lt	Millipore
EKG Kayıt Cihazı	Biopac Systems Ins-Mp36
Elektroforez Cihazı ve Güç Kaynağı	Biorad
Elektron mikroskobu öncesi vakumlu kaplayıcı ACE200	Leica
Fiji yazılımı (v1.52)	ImageJ
Forseps (11252-30)	Dumont #5 Standard-
Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Cihazı (CFX CONNECT)	Biorad
GraphPad Prism versiyon 8.0	GraphPad Software, LLC
Hamilton enjektörü	Hamilton-80301-701LT
Hassas terazi	Ohaus
Jel görüntüleme cihazı ChemiDoc	Bio-Rad
Karbondioksit İnkübatörü STERI-CYCLE i160	Thermo Scientific
Konfokal Mikroskopu LSM800	Zeiss
Konfokal Mikroskopu LSM880	Zeiss
Kryostat kesit alma cihazı CM 1950	Leica
MicroCL 17R Mini Santrifüj	Thermo Scientific
Mikrodalga Fırın	Samsung
Mikropipet Takımı	Gilson
Mikrosantrifüj MicroCL 17R	Thermo Scientific
Nanodrop Nükleotid Kalite ölçüm cihazı	Thermo Scientific
Pipetör Tabanca	Gilson
Primovert Invert Işık Mikroskobu	Zeiss-Discovery V8
PZR cihazı (Thermal Cycler)	Bio-Rad
Santrifüj cihazı	Thermo Scientific
SpectraMax i3 Çok Modlu Mikroplaka Okuyucu Platform	Molecular Devices
Spinning Disc Konfokal Mikroskopu	Zeiss

Taramalı elektron mikroskobu GeminiSEM 500	Zeiss
Thermal ısıtıcı	Bio-Rad
Tip 2 Hücre Kültürü Kabini Safe 2020	Thermo Scientific
Tüp döndürücü cihaz	DLAB Mx-T6-S
Vorteks cihazı	Heidolph

UPKH, uPKH kökenli kardiyomiyositler ve monosit kaynaklı makrofajların kültürü ve kriyoprezervasyonu gibi temel sarf malzemeler Tablo 5.2’de listelenmiştir. Hücre kültüründe kullanılan besiyeri içerikleri Tablo 5.3’de verilmiştir.

Tablo 5.2 Hücre kültüründe kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası
0,22 µm Filtre (13 mm çaplı)	Thermo Scientific	720-1320
0,22 µm Filtre (33 mm çaplı)	Merck Millipore	SLGP033RS
100 mm plastik tabanlı petri	Corning	430167
12 kuyucuklu hücre kabı	Cell Star	665 180
13 mm cam tabanlı petri	Thermo Scientific	150680
15 ml falkon tüp	Falcon	352096
250 ml sıvı filtreli besiyeri kabı	Merck Millipore	05045
35 mm cam tabanlı petri	FluoroDish	FD35-100
35 mm plastik tabanlı petri	Thermo Scientific	130180
50 ml falkon tüp	Falcon	352070
500 ml sıvı filtreli besiyeri kabı	Merck Millipore	12969
6 kuyucuklu hücre kabı	Corning	3516
B27 takviye (insülinli)	Thermo scientific	17504044
B27 takviye (insülinli)	Thermo scientific	A1895601
Bazik FGF	Merck Millipore	GF003AF_MG
CD14 ⁺ Monosit izolasyon MACS kiti	Miltenyi	130-050-201
CHIR99021 küçük molekül	Sigma-Aldrich	SML1046
CytoTune-iPS Sendai 2.0 yeniden programlama kiti	Thermo scientific	A16517
DMEM	Gibco	41966-029
DMEM/F12	Gibco	11330-038
DMSO (Dimetil sülfoksit)	ATCC	4-X-5
DnaseI Kit (enzim + solüsyon)	Roche	4716728001
DPBS (Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	Gibco	14040-091
DPBS (Dulbecco’s phosphate-buffered salin) (Ca ²⁺ -, Mg ²⁺ -)	Gibco	14190-094
EDTA (Etilendiamintetraasetik asit) 0,5 M	Invitrogen	15575-038
Essential 8 Basal Medium	Gibco	A15169-01

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası
Essential 8 Takviye	Gibco	A15171-01
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco	10270-106
Fibronektin	Sigma-Aldrich	F1141-1MG
Ficoll-Paque Histopaque®-1077	BD Biosciences	10771
FLT-3 Ligand rekombinant insan sitokini	Miltenyi	130-096-476
Fluo-4-AM (Acetoxymethyl)	Life Technologies	F14201
G-CSF rekombinant insan sitokini	Miltenyi	130-093-860
Geltrex	Corning	A14133-02
Glukozsuz RPMI-1640	Multicell	350-060-CL
GlutaMAX	Gibco	35050-61
GM-CSF büyüme faktörü	R&D Systems	215-GM-010
HEPES Buffer (1M)	Sigma-Aldrich	H0887
IL-3 rekombinant insan sitokini	R&D Systems	203-IL-010
iMatrix-511	Takara	T304
IWP-2 küçük molekül	Tocris	3533
IWP-4 küçük molekül	Tocris	5214
IWR-1 endo küçük molekül	Tocris	3532
Jelatin toz	Sigma-Aldrich	G9391-100g
Kolajenaz A	Roche	10103586001
Kolajenaz B	Roche	110888815001
Kolajenaz II	Gibco	17101015
Kolajenaz IV	Gibco	17104-019
KOSR (Knockout serum)	Gibco	10828-028
Kriyotüp vial	Nunc	363401
Laminin	Sigma-Aldrich	L2020
LysoTracker™ Green DND-26 lizozom işaretleyici	Thermo scientific	L7526
M-CSF büyüme faktörü	R&D Systems	216-MCC-010
Matrigel	Corning	354277
Matrigel Matriks	Corning	354277
Mitomiyocin C	Sigma-Aldrich	M4287-2MG
NBCS (Newborn Calf Serum)	Gibco	16010167
NEAA (Non-Essential Amino Acid)	Gibco	11140-050
P/S (Penicilin-Streptomisin)	Gibco	15140-122
Pluronic asit F-127	Merck Millipore	P2443
PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)	Sigma-Aldrich	P8139
Poli-L-lizin	Sigma-Aldrich	P6282
RITC (Rhodamine izothiosiyanat)-dextran	Sigma-Aldrich	R8881
RPMI-1640 bazal besiyeri	Gibco	21875034
SCF (Stemcell factor) rekombinant insan	R&D Systems	255-SC-010
Sodyum L-Laktat	Sigma-Aldrich	71718
β-Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich	444203

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası
Stem-Cell Banker hücre dondurma solüsyonu	ZENOAQ	CB046
StemPro™-34 SFM	Thermo scientific	10639011
T25 hücre kültürü flaskı	Corning	353109
T75 hücre kültürü flaskı	Corning	430641U
TPO	Gibco	PHC9514
Triphan mavisi hücre sayımı boyası	Sigma-Aldrich	T8154
TrypLE Express rekombinant enzim	Thermo scientific	12604013
Y-27632 ROCK İnhibitör	Millipore	SCM075

Tablo 5.3 Hücre kültüründe kullanılan besiyeri içerikleri. uPKH: Uyarılmış pluripotent kök hücre. NEAA: Non-essential amino asit. MACS: Manyetik aktif hücre ayırıştırma. DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered salin. EDTA: Etilendiamintetraasetik asit. FBS: fetal bovin serum. NBCS: Newborn calf serum. P/S: Penisilin-Streptomisin. M-CSF: Makrofaj koloni stimüle edici faktör. G-CSF: Granülosit koloni stimüle edici faktör. GM-CSF: Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör. bFGF: Bazik fibroblast büyüme faktörü. IL: İnterlökin. SCF (Stem cell factor): Kök hücre faktörü, c-kit ligandı. TPO: Thrombopoietin. FLT-3: Fms ilişkili tirzin kinaz reseptörü-3.

Besiyeri	Miktar
uPKH Programlama PBMC besiyeri	
RPMI 1640	50 ml
G-CSF	10 ng/ml
IL-3	2 ng/ml
SCF	100 ng/ml
TPO	20 ng/ml
FLT-3	100 ng/ml
Pen/Strep	%1
Besleyici Tabakalı uPKH besiyeri	
DMEM/F12	250 ml
KnockOut Serum	%20
GlutaMAX	%1
NEAA	%1
P/S	%1
β-Merkaptoetanol	0,015 mM
bFGF	10 ng/ml
Matrigel matriksi için uPKH besiyeri	
Essential 8 Basal Medium	50 ml
Essential 8 Supplement	50X
P/S	%1

Besiyeri	Miktar
Kardiyomiyosit Farklılaşma Besiyeri	
RPMI 1640	50 ml
B-27 Supplement (insüliniz)	50X
GlutaMAX	%1
NEAA	%1
P/S	%1
β-Merkaptoetanol	0,015 mM
CHIR99021	6 µM
WNT yolağı bloklayıcı küçük moleküler	5µM
Kardiyomiyosit Besiyeri	
RPMI 1640	50 ml
B-27 Supplement (insülinli)	50X
GlutaMAX	%1
P/S	%1
β-Merkaptoetanol	0,015 mM
Kardiyomiyosit Zenginleştirme Besiyeri	
RPMI-1640 (without/ D-Glucose)	50 ml
Sodium L-Lactate	10 mM
HEPES Buffer (1M)	40 X
THP-1 Monosit Besiyeri	
RPMI-1640	50 ml
FBS	%20
NEAA	%1
GlutaMAX	%1
P/S	%1
NA-Pirüvat	%1
β-Merkaptoetanol	0,015 mM
THP-1 Makrofaj Farklılaştırma Besiyeri	
RPMI-1640	100 ml
PMA	100 ng/ml
MACS Solüsyonu (pH 7.2)	
DPBS (+CaCl ₂ +MgCl ₂)	250 ml
FBS	%0,5
EDTA	2 mM

Besiyeri	Miktar
CD14⁺ Monositler Makrofaj Farklılaştırma Besiyeri	
RPMI-1640	50 ml
NBCS	%10
GlutaMAX	%1
P/S	%1
β -Merkaptoetanol	0,015 mM
NEAA	%1
M-CSF	50 ng/ml
GM-CSF	25 ng/ml
Makrofaj Besiyeri	50 ml
RPMI-1640	
NBCS	%5
GlutaMAX	%1
P/S	%1
NEAA	%1
β -Merkaptoetanol	0,015 mM
Kökültür Besiyeri	50 ml
Kardiyomiyosit besiyeri	%50
Makrofaj Besiyeri	%50

Tez çalışmasında uygulanan tüm moleküler tekniklerde Tablo 5.4'te yer alan sarf malzemeler kullanılmıştır. Yapılan tez çalışmasının immünboyamalarında kullanılan tüm sarf malzemeler Tablo 5.5'te, solüsyon içerikleri Tablo 5.6'da ve antikorlar Tablo 5.7'de verilmiştir.

Tablo 5.4 Moleküler tekniklerde kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası
40 μ m naylon filtre	Thermo scientific	22363547
Agaroz toz	Wisent	800-015-EG
DNaseI enzim kiti, RNase-Free (50 örnek)	Qiagen	79254
Ependorf Tüpleri	Axygen	MCT-150-R
FACS polistren tüp 5 ml	Corning	352235
Hücre kaldırıcı (Lifter)	Corning	3008
Hücre kazıyıcı (Scraper)	Corning	3010

İnsan TruStain FcX™ (Fc reseptör bloklayıcı antikor karışımı, anti-CD16/CD32)	Biolegend	422301
iScript™ cDNA sentez kiti	Bio-Rad	172-5037
iTaq Universal SYBR yeşil süpermiks	Bio-Rad	172-5124
Jel yükleme boyası	BioLabs	B7024S
LS boyutlu MACS kolonu	Miltenyi	130-042-401
Midi boy MACS manyetik tabla	Miltenyi	130-042-302
ProLong™ Diamond doku koruyucu solüsyon	Thermo scientific	P36961
PZR 8 sıralı ependorf tüpü	Bio-Rad	TLS0801
RED Extract-N-Amp Tissue PZR kiti	Sigma-Aldrich	254-457-8
RNA İzolasyon Kiti	Roche	11828665001
Rnase/Dnase İçermeyen Su	Sigma	W4502
SYBR Safe DNA bağlayan boya	Invitrogen	S33102

Tablo 5.5 İmmün boyamalarda kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası
Absolüt etanol %96,9	Tekkim	
BSA (Bovine serum albumin)	Capricorn	BSA1S
Doku dondurma kalıpları (15 X 15 X 5 mm)	Electron microscopy sciences (EMS)	62352-15
Doku dondurma solüsyonu OCT	Leica Biosystems	14020108926
Entellan	Millipore	107960
Keçi serumu	Gibco	16210064
Kimwipe Fiber Peçete	Kimtech	MT02625
Ksilen	Chemsolute	1330-20-7
Lamel (24x60mm)	Eprendia	
Masson Trikrom boyama kiti	Bio-Optica	04010802
MTT Canlılık kiti Vybrant®	Gibco	V-13154
PAP Pen hidrofobik kalem	Sigma Aldrich	Z672648-1EA
Paraformaldehit	Sigma Aldrich	158127
Pozitif yüklü mikroskop lamı (26x76mm) 1mm kalınlık	Laborant	ANT-MS90PC01W
Sodyum Azid	Sigma	S8032
Triton X-100	Sigma Aldrich	9002-93-1
Tween® 20	Sigma Aldrich	9005-64-5

Tablo 5.6 İmmün boyamalarda kullanılan solüsyon içerikleri

Solüsyon	Miktar	Solüsyon	Miktar
Bloklama solüsyonu	50 ml	Dilüsyon solüsyonu	50 ml
Keçi serumu	%3	Keçi serumu	%3
Triton-X-100	%0,1	Tween-20	%0,2
BSA	%3	BSA	%3
DPBS (+CaCl ₂ +MgCl ₂)		DPBS (+CaCl ₂ +MgCl ₂)	

Tablo 5.7 İmmünokimyasal boyamalarda kullanılan birincil ve ikincil antikorlar

Antikor tipi	Antikor	Şirket	Katalog no	Dilüsyon
Primer antikorlar	Anti-Kardiyak Troponin I Antikoru	Abcam	ab47003	1:500
	Anti-Kardiyak Troponin T Antikoru	Thermo scientific	MS-295	1:500
	Anti-Koneksin 43/GJA1 Antikoru	Abcam	ab11370	1:1000
	Anti-CD68 Antikoru	Biolegend	333801	1:250
	Anti-iNOS Antikoru	Thermo scientific	PA3-030A	1:1250
	Anti-LAMP1 Antikoru	Cell Signaling Technology	9091S	1:500
	Anti-TRA-1-60 Antikoru	Millipore	90232	1:200
	APC anti-CD14 Antikoru	Biolegend	301808	1:250
Sekonder (İkincil) antikorlar	Anti-fare IgG (H+L) İkincil Antikor. Alexa Fluor 546	Thermo scientific	A11003	1:500
	Anti-fare IgG (H+L) İkincil Antikor. Alexa Fluor 633	Thermo scientific	A21050	1:1000
	Anti-fare IgG (H+) İkincil Antikor. Alexa Fluor 488	Cell Signaling Technology	4408S	1:500
	Anti-tavşan IgG (H+L) İkincil Antikor. Alexa Fluor 546	Thermo scientific	A11010	1:1000
	Anti-tavşan IgG (H+L) İkincil Antikor. Alexa Fluor 633	Thermo scientific	A21070	1:1000
	Anti-tavşan IgG (H+L) İkincil Antikor. Alexa Fluor 488	Cell Signaling Technology	4412S	1:500
Konjuge antikorlar	Anti-Oct-4A Antikoru Alexa Fluor 488	Cell Signaling Technology	5177	1:50
	FITC anti-CD11B Antikoru	Biolegend	101206	1:200
	FITC IgGb κ izotip kontrol antikoru	Biolegend	400633	1:200
	Anti-CD206 (MMR) Antikoru Alexa Fluor 488	Biolegend	321113	1:250
	Anti-CD68 Antikoru Alexa Fluor 488	Biolegend	333811	1:250
	Wheat Germ Agglutinin Alexa Fluor 647 (WGA)	Thermo scientific	W32466	1:1000
Çekirdek boyası	DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	Sigma	D9542	1:1000
Canlılık boyası	Propidyum iyodür (PI)	Sigma-Aldrich	P4170	2 µg/ml

Tablo 5.8 *Ex vivo* deneylerde kullanılan sedatifler

Kimyasal ismi	Marka	Katalog numarası
Ketazol	Richterpharma	3516
Roumpun	Bayer	430720U

5.2 *Ex Vivo* Deneyler

Transgenik fare soyları, Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan 'National Institute of Health' kurumunun laboratuvarlarında görevli Prof. Karl Pfeifer tarafından laboratuvarımıza hibe edildi. Transgenik fare soylarının bakımı ve üretilmesi İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM) bünyesinde gerçekleştirildi. Tez çalışmasının deney hayvanlarında yapılan işlemlerinde, 6-12 haftalık yetişkin, eşit sayıda dişi ve erkek C57BL/6 vahşi tip fare ve CPVT (588D) isimli transgenik soyunun homozigot mutant genotipli (*Casq2*^{-/-}) fareleri kullanıldı.

5.2.1 Genotip analizi

Casq2^{-/-} genotipinde transgenik fare soyundan kardeş olmamak şartıyla bir kafese alınan heterozigot veya homozigot genotipli 3 dişi ve 1 erkek fare ile çiftleşme kafesi oluşturuldu. Dişilerden birinin gebe olması durumunda kafesler ayrıldı ve 3 hafta içerisinde doğum beklendi. Doğumdan 30 gün sonra farelerin kulak dokusu ucundan, alkolle sterilize edilmiş kulak delgeci ile 0,5-1 cm çapında örnek alındı ve steril ependorf tüplere aktarıldı. Dokular için farenin bulunduğu kafes ve soy bilgileri kaydedildi. Transgenik fare kulak dokusundan genomik DNA izolasyonu için her bir örneğe 75 µl ekstraksiyon solüsyonu eklendi ve pipetajla karıştırıldı. DNA lizisi için alternatif olarak (25 mM NaOH + 0,2 mM EDTA) karışımı da kullanılabilir. Solüsyonun içerisinde bulunan doku, oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra örnekler, PZR cihazında 98 °C'de 1 saat inkübe edildi. Her bir örnekten 25 µl ayrıldı ve üzerine aynı miktarda nötralizasyon solüsyonu (40 mM Tris HCl pH: 5.5) eklenerek iyice pipetlendi, böylece genomik DNA izolasyonu tamamlandı. Kulak dokularından izole edilen genomik DNA ile, RED Extract-N-Amp Tissue PZR kiti protokolü takip edilerek genotipleme yapıldı (Tablo 5.9, Tablo 5.10). Transgenik farelerin mutasyon bölgesine spesifik olarak tasarlanmış PZR primer dizileri Tablo

5.11’de verilmiştir. *Casq2*^{-/-} transgen bölgesine spesifik primerler ile PZR yapılarak çoğaltılan DNA fragmanları, %1,5 agaroz jelde bant boylarına göre ayrıldı. PZR ürünleri Biorad Chemi-doc cihazı ile görüntülendi ve referans bantlar ile karşılaştırılarak transgenik farelerin genotip analizi tamamlandı.

Tablo 5.9 Fare genotiplemesinde PZR’da kullanılan malzemeler

İçerik	Reaksiyon için gerekli hacim (µl)
Red Extract	5 µl
Primer (10 µM)	1,5 µl (3 primer her birinden 0,5 µl)
DNA	1 µl
H ₂ O	2,5 µl
Toplam hacim	10 µl

Tablo 5.10 Genotiplemede kullanılan PZR protokolü

Sıcaklık	Zaman
95°C	5 dakika
95°C	30 saniye (35 döngü)
62°C	30 saniye (35 döngü)
72°C	1 dakika (35 döngü)
72°C	10 dakika
4°C	Gece boyu

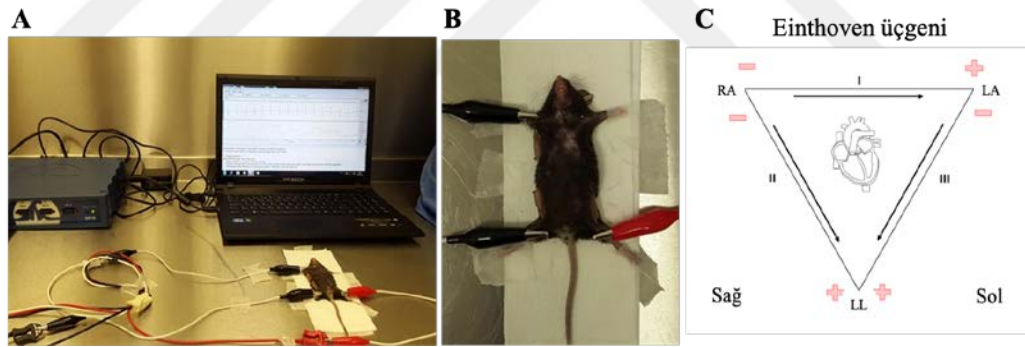
Tablo 5.11 Genotiplemede kullanılan PZR primerleri

Primer	Baz dizisi 5’-3’
15777R	CCACCTTAAGAGTTTGCCACAG
14550F	CACCGGCTTCCCTGCCTCCCACAGC
14762R	CGAGGACAGGCACACTCTCCACATGC

5.2.2 Elektrokardiyografi (EKG) kaydı alınması

Farelerde genotip ve fenotip ilişkisini incelemek amacıyla, Biopac Student Lab EKG analiz sistemi kullanıldı (Şekil 5.2 A). Vahşi tip ve CPVT homozigot mutant farelerin EKG analizlerinde, eşit sayıda dişi ve erkek *Casq2*^{-/-} fareler ve bu fare soyuna ait olmayan, hiçbir bilinen hastalığa veya tümöre sahip olmayan 6-12 haftalık vahşi tip fareler kullanıldı. 100 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg roumpun sedatifleri bir şırıngada

karıştırılarak vahşi tip ve transgenik farelere kasık boşluğundan periton bölgelerine 3cc enjekte edildi ve fareler anestezide alındı. Farenin anestezide girip girmediği, ekstremitelerine uygulanan baskıya verdikleri refleksleriyle kontrol edildi. Fare bu uyarılara herhangi bir refleks göstermiyor ise EKG kaydı almak üzere ön ve arka ekstremiteleri bant yardımıyla strafor tabaka üzerine supin pozisyonda sabitlendi (Şekil 5.2 B). EKG verilerinde oluşabilecek sapmaları önlemek için kayıtlar, sessiz ve izole bir alanda alındı. Farelerin sağ üst, sağ alt ve sol alt ekstremitelerine elektrodlar bağlandı (Şekil 5.2 B). EKG ölçümleri, Einthoven üçgeni referans alınarak kaydedildi (Şekil 5.2 C). Einthoven üçgeni sol bilek, sağ bilek ve sağ ayağın oluşturduğu düşünülen ve ortasında kalbin bulunduğu teorik eşkenar üçgendir. Bu üçgen kol bilekleri ve ayağa bağlanan elektrotlardan elde edilen potansiyel ölçümleri ile kalp vektörünün yön ve büyüklüğü arasındaki ilişkinin anlaşılması için kullanılır. Lead II’de 1 dakika boyunca 2 kere alınan kayıtlar, Biopac Student Lab programıyla analiz edilerek EKG parametreleri belirlendi ve grafikler oluşturuldu.



Şekil 5.2 Transgenik farelerden EKG kaydı alınması. (A) EKG kayıt cihazı (Biopac Student Ins). (B) Lead II elektrotlarının kayıt almak üzere fareye bağlanması. (C) Einthoven üçgeni. RA: Right arm. LA: Left arm. LL: Left leg.

5.2.3 Doku alımı, saklanması ve kesit alınması

Vahşi tip sağlıklı ve *Casq2^{-/-}* farelerin EKG kayıtları alındıktan en az 1 hafta sonra, fareler karbondioksit ile ötenazi veya servikal dislokasyon ile kurban edildi. Kurban edilen farelerden kalp ve dalak dokuları, herhangi bir yıkama işlemi yapılmadan hızlıca kuru buz üzerine alındı ve her yüzü dondurularak ependorfa alındı ve -80 °C’de saklandı. Dokular, kesit alınmadan 2 saat önce, -20 °C olan kesit alma

cihazının içerisine alınarak 15 mm x 15 mm x 5 mm boyutlarındaki kalıplara OCT yardımı ile gömüldü. OCT'nin donması beklendi ve dokular kalıptan çıkartılıp cihazın metal bloğuna yapıştırıldı. Fare kalplerinden uzunsal (longitudinal) olarak 15-20 mikronluk doku kesitleri alınarak pozitif şarjlı lamlara, her lama 8 kalp dokusu gelecek şekilde yerleştirildi. Kesitler, 42 °C'de en az 30 dakika termal ısıtıcı üzerinde inkübe edildi. Kesitler daha sonra özel kesit kutusunda -20 °C'ye kaldırıldı. Boyama yapılacağı zaman kesilen dokuları içeren lamalar, 20 °C'den oda sıcaklığına çıkartılarak dokuların ısisının eşitlenmesi sağlandı. Fare kalplerinden kesitler, AV nodu içeren sağ atriyum bölgesinin tamamını kapsayacak şekilde alındı.

5.2.4 Kalp kesitlerinde mason trikrom boyama

Mason Trikrom boyama, doku kesitlerinde veya sitolojik preparatlarda kas ve bağ dokuyu ayırt etmek üzere özel olarak üretilmiştir. Kalpte AV nod bölgesi koruyucu bir bağ dokusu içerisinde yer alan bir lokasyon olduğu için kas ve bağ dokunun ayrımını net bir şekilde sağlayan Mason Trikrom boyama, AV nod bölgesi tespiti için uygun bir boyama yöntemidir. Mason Trikrom kiti kasların, kollajen fibrillerinin, bağ dokuların, çekirdeklerin, nörofibrillerin, nörogliaların, kollajenin, hücreler arası keratin fibrillerinin görüntülenmesi ve Golgi aygıtının negatif görüntülenmesi için kullanılır. Dokularda kas ve kollajen fibrillerinin boyanması yönteminde kullanılan Anilin mavisi boyası kollajene bağlanarak belirgin bir mavi renk almasını sağlar (189).

Dokular %4 PFA içeren şale içerisinde oda sıcaklığında 15-20 dakika fikslendi. Fiksasyon sonrası slaytlar 2 kez PBS içeren şale içerisinde yıkandı. Yıkamanın ardından slaytlar, 1 kez 5 dakika boyunca PBS içeren şale içerisinde bekletildi. Dokuların etrafı Kimwipe ile kurulanarak Pap pen kalemi ile çizildi. Masson Trikrom boyama kit içerisindeki Reagent A ve Reagent B her kalp için 1 damla olacak şekilde 15 ml falkonda vortekslenerek karıştırıldı. Bu karışım dokuların üzerine eşit şekilde yayılır ve çalkalayıcı üzerinde 10 dakika inkübe edildi. Boya aspire edildi ve dokular yıkanmadan üzerlerinde Reagent C (Pikrik asit) birer damla olacak şekilde eklendi ve 4 dakika inkübe edildi. Dokular hızlıca su ile şalede yıkandı ve üzerlerine Reagent D eklendi, tekrar 4 dakika inkübe edildi. Dokular tekrar su ile şalede yıkandı ve

üzerlerine Reagent E eklendi, 10 dakika inkübe edildi. Fazla boya alındı, dokular yıkanmadan üzerlerine Reagent F eklendi, 5 dakika inkübe edildi. Dokular su ile yıkanmadan artan alkol serilerinden (%70-96-100) geçirilerek en son absolüt etanol içerisinde 1 dakika bekletildi. Dokular çeker ocak altında ksilene batırılıp çıkartıldı ve kuruduktan sonra entellan ile kapatılarak Axio Zoom V.16 mikroskobunda incelendi.

5.2.5 Kalp kesitlerinde immünfloresans boyamalar

Ex vivo olarak incelenen dokulardan alınan kesitler, boyanmadan 15 dakika öncesinde -20 °C'den oda sıcaklığına çıkartıldı. Dokuların boyanacak kesitlerinin etrafı, hidrofobik bariyer oluşturan pappen ile çizilerek işaretlendi. Dokuların üzerine %4 PFA eklendi ve doku kesitleri 15 µm ise 15 dakika, 20 µm ise 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hücreler PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra Tablo 5.6'da içeriği belirtilen bloklama solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edildi. Hedef proteinleri işaretlemek amacıyla Tablo 5.7'da belirtilen primer antikolar veya konjuge antikolar, Tablo 5.6'da belirtilen içerikte hazırlanmış dilüsyon solüsyonu içerisinde hücrelerin üzerine eklendi. İnkübasyon, +4 °C'de 12-16 saat boyunca gerçekleştirildi. Lamlar ertesi gün 1 kez PBS ile yıkandıktan sonra floresan görüntü alabilmek için kullanılan primer antikolara bağlanabilen floresan özellikli sekonder antikolar kullanıldı. Tablo 5.7'te belirtilen konsantrasyonlarda sekonder antikolar dilüsyon solüsyonu içerisinde lam üzerine eklenerek karanlıkta ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda dokular üç kez %0,2 Tween-20 içeren PBS ile yıkanarak bağlanmamış antikolar ortamdaki uzaklaştırıldı. Görüntüleme öncesi hücrelere çekirdek boyası DAPI eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Dokuların fazla sıvısı kimwipe peçete ile alındı ve dokuların kuruması beklendi, daha sonra ile slaytlar kapama solüsyonu ve uygun lamel ile kapatıldı. Lamların kenarı ojelenerek sabitlendi ve oda sıcaklığında 1 gece bekletildi. Ertesi gün örnekler konfokal floresan mikroskobu ile görüntülendi.

5.3 *In Vitro* Deneyler

Medipol Üniversitesi Hastanesi Pediatrik Kardiyoloji Anabilim dalına başvuran hastaların ve aile bireylerinin klinik anamneziyle EKG incelemesi

yapıldıktan sonra mutasyon tespiti için tüm gen dizi analizi gerçekleştirildi. Bu analiz sonucu kardiyak gen panelinde iyon kanalı genlerinde (*SCN5A*, *KCNQ1*, *KCNH2* ve *RYR2* genleri) mutasyon tespit edilen kişiler bu tez çalışmasına dahil edildi. Aritmi ile ilişkilendirilmiş genlerde mutasyon bulundurmadığı doğrulanan ve klinik incelemede kardiyovasküler hastalık riski taşımayan sağlıklı bireyler kontrol grubuna dahil edilmiştir. Projede yer alan tüm gönüllüler onam formlarını imzalamış ve bilgileri kaydedilmiştir.

5.3.1 PBMC izolasyonu

Periferik kan mononükleer hücrelerinin (PBMC) izolasyon protokolü, mononükleer hücrelerin yoğunluk gradyanı yöntemi ile tam kandan doğrudan ayrılmasıdır. PBMC izolasyonu metodundan, immün sistem hücrelerinin farklılaştırılması, tek hücre (single-cell) teknolojileri ile immün sistem hücrelerinin profilinin çıkarılması ve hem temel bilimler hem de klinik deneylerde terapötiklerin değerlendirilmesi noktalarında sıklıkla faydalanılmaktadır. Önemli olarak PBMC izolasyonu ile elde edilen hücreler, stabil olarak uzun süreli dondurularak saklanabildi ve çözülüğünde ise yüksek canlılık gösterdi.

Bu tez kapsamında, hasta ve sağlıklı kontrollerden 10 ml periferik kan oda sıcaklığında steril şartlarda antikoagülanlı (heparinli) tüplere alındı ve aynı gün içerisinde SABITA merkezinde bulunan laboratuvarımızda PBMC izolasyonu yapıldı. 50 ml falkona aktarılan kanın hacmi, steril DPBS (Ca^{2+} -, Mg^{2+} -) ile 20 ml'e getirildi. Tüp 8-10 kez çevrilerek kanın homojenize olması sağlandı. Şişesinden bir enjektör yardımıyla alınan Ficoll-Paque çözeltisi, steril bir falkona eklendi. Kan süspansiyonu fikal üzerinde kalacak şekilde 3:4 oranında dikkatlice ve yavaşça pipet ucuyla falkon duvarından süzdürüldü. Hücreler 20 °C, 400xg'de 40 dakika santrifüj edildi (Santrifüj ayarları: hızlanma: 4, yavaşlama: 0). PBMC'leri içeren bulut tabakası (buffy coat) pipet yardımıyla çekilerek yeni bir 15 ml falkona aktarıldı. Üzerine en az 3 katı olacak şekilde DPBS (Ca^{2+} -, Mg^{2+} -) eklenerek 500xg'de 10 dakika 20 °C'de santrifüj edildi. Süpernatanı tamamen aspire edilip DPBS ile yıkandı ve 500xg'de 10 dakika 20°C'de tekrar santrifüj edildi. Hücre pelleti 1-2 ml MACS solüsyonu ile dilüe edilip 10 µl Triphan mavi boyası ve 10 µl hücre karışımı yapılarak hücre sayımı yapıldı.

5.3.2 PMBC'lerin yeniden programlanmasıyla uPKH üretilmesi

PBMC kültürlerinin viral yolla uPKH'lerine yeniden programlanması amacıyla CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Life Technologies) protokolü kullanıldı. PBMC hücreleri yeniden programlama öncesi 6 gün çoğaltılması amacıyla, taze sitokinleri (G-CSF, SCF, FLT-3, TPO, IL-3) içeren UPKH programlama PBMC besiyeri (Tablo 5.3) ile 24 kuyucuklu hücre kaplarına ekildi ve 4 gün boyunca besiyerinin yarısı çekilerek taze besiyeri koyuldu (190). 37°C %5 CO₂ koşullarında inkübatörde kültür edilen hücreler %70-80 yoğunluğa ulaşınca Sendai virüsü, Tablo 5.12'de kit protokolüne göre özetlenen enfeksiyon birimi (MOI: Multiplicity of infection) değerlerine uygun şekilde hücrelere eklendi. Sendai virüsü ile enfekte edilen hücrelerin besiyeri 7 gün boyunca her gün PBMC besiyeri ile değiştirildi. Transdüksiyon sonrası 7. günde PBMC'ler pipetleme ile ayrıştırılarak hücre sayımı yapıldı. Bir gün önce 100 mm hücre kaplarına ekilerek mitotik bölünmesi 10ug/ml Mitomiyocin C ile durdurulan fare embriyonik fibroblast (FEF) besleyici (feeder) hücreleri üzerine 100-500x10³ arasında virüs ile enfekte edilmiş insan PBMC hücreleri ekildi. Ekimden sonra, günlük olarak hücrelerin besiyeri, 10 ng/ml bFGF içeren besleyici tabakalı (feeder) uPKH besiyeri ile değiştirildi. 21 gün boyunca her gün besiyeri değiştirildi. Koloniler belirginleşip olgunlaşana kadar bu işleme devam edildi. Kök hücre benzeri koloniler yeterli büyüklüğe erişince, Kolajenaz IV enzimi ile pasajlanarak önce 12 kuyucuklu kaplara ve ardından 6 kuyucuklu hücre kaplarına ekildi. 6 kuyucuklu plaklara pasajlanan koloniler her pasajda Stem Cell Banker solüsyonu ile dondurulurken, bir kısmı da Y-27632 (Rock sinyal yolağı inhibitörü) kullanılarak yeni kuyucuklara pasajlandı.

Tablo 5.12 Yeniden programlamada kullanılan Sendai virüsü enfeksiyon koşulları

İçerik	Titre*(CIU/mL)	Hacim	MOI
CytoTune™ 2.0 hKOS	1.4x10 ⁸	21 µl	5
CytoTune™ 2.0 hc-Myc	1.0x10 ⁸	30 µl	5
CytoTune™ 2.0 hKlf4	1.5x10 ⁸	2 µl	3

Bu tez çalışmasında uPKH'ler, FEF besleyici hücre içermeyen (feeder-free) ortamda Matrigel ekstraselüler matriks proteini üzerinde büyütüldü. Bunun için öncelikle, 6 kuyucuklu ticari hücre kültürü kapları, %1 oranında soğuk DMEM/F12 bazal besiyerine eklenen ile kaplandı ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Hücre ekilmeyen kaplar +4 °C'de 2 hafta boyunca saklandı. Matrigel, hücreler ekileceği zaman kaplardan çekilip atıldı ve kuyucuklara 2 ml E8 besiyeri ile hücreler eklendi (Tablo 5.3). Kültürlerin pasajı, %80-90 yoğunluğa ulaştıklarında 0,5 mM EDTA ile yapıldı. Kültürler önce DPBS (-Ca²⁺, -Mg²⁺) ile 2 kere, ardından 1 kere 0,5 mM EDTA ile yıkandı. Hücreler 0,5 mM EDTA ile 3 dakika 37 °C'de inkübe edildi. EDTA çekilerek atıldı ve hücreler E8 besiyeri ile 15 ml falkonlara toplandı. Toplanan hücreler 1:3 ve 1:5 arasında bölünerek pasajlandı ve 37°C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edildi. Hücreler, kardiyomiyositlere farklılaştırılmadan önce %70-80 yoğunluğa ulaştıklarında İstanbul Genetik Grubu Genetik Tanı Merkezi'nde karyotip analizleri yapıldı.

5.3.3 UPKH kültüründen kardiyomiyosit farklılaştırılması

Bu tez çalışmasında, sağlıklı bireyden ve *SCN5A*^{F1465L/+} mutasyonu taşıyan konjenital aritmi hastanın somatik hücrelerinden yeniden programlanarak üretilmiş uPKH kültürlerinden WNT (Wingless-related integration site) sinyal yolağı manipülasyonu ile kardiyomiyosit farklılaşması yapıldı. Hücre yoğunlukları %85-90 seviyelerine erişince, uPKH'lerine, ilk 2 gün 6 µM CHIR99021 küçük moleküllü (WNT sinyal yolağı aktivatörü, GSK-3 inhibitörü) içeren kardiyomiyosit farklılaşma besiyeri eklendi (Tablo 5.3). İkinci günde hücrelerin besiyeri, faktör eklenmeyen kardiyomiyosit farklılaşma besiyeri ile değiştirildi ve 3. günde WNT sinyal yolağının inhibisyonu, WNT inhibitörü küçük moleküllerden 5 µM IWR-1 (IWP-2 veya IWP-4) eklenerek sağlandı. Besiyeri 5. gün faktörsüz kardiyomiyosit farklılaşma besiyeri ile değiştirildi. Besiyeri insülin içeren kardiyomiyosit besiyeri ile 7. günde değiştirildi (Tablo 5.3) ve tüm hücrelerin besiyeri, spontan kasılan kardiyomiyositler oluşana kadar 3 günde bir yenilendi. Hücreler bu süreçte 37 °C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edildi (191). Kardiyak kültürlerde kardiyomiyosit olmayan hücre yoğunluğunun fazla

gözlendiği durumlarda sodyum-L-laktat içeren kardiyomiyosit zenginleştirme besiyeri ile 12.-18. günler arası inkübe edildi (Tablo 5.3).

5.3.4 Kardiyomiyositlerde yeniden ekim protokolleri

Kardiyomiyositlerin tekli kültürlerini ve makrofajlar ile kokültürlerini oluşturabilmek için, öce kardiyomiyositleri enzimatik ve enzimatik olmayan ajanlar kullanılarak ayrıştırdık. Daha sonra ayrıştırdığımız hücrelerin, çeşitli matrikslerle kaplanmış cam tabanlı petrilere veya bulundukları kaptan daha küçük kaplara, tek hücreli olacak şekilde yeniden ekimini gerçekleştirdik. Yeniden ekim protokollerini, kardiyomiyosit kültürlerin olgunlaşmamış (15-35. günleri arasında) ve matür (60-160. günleri arasında) günlerinde gerçekleştirdik.

Bu deneyde kullanılan matriksler; kardiyomiyosit ve embriyonik kök hücre çalışmalarında kullanılan fibronektin, laminin, laminin türevi iMatrix-511, Matrigel ve Geltrex'dir (83). Matrikslerin petrilere kaplama konsantrasyonları şu şekildedir;

- i. Poli-L-lizin, DPBS içinde 1:10 seyreltilerek hazırlandı ve kültür kaplarının kaplanması için 2 saat 37 °C'de inkübe edildi. Kuyucuklar distile su (dH₂O) ile üç kez yıkandıktan sonra, laminin 10 µg/cm² olacak şekilde distile dH₂O ile karıştırılarak petrilere kaplandı. 37 °C'de 2 saat süreyle inkübe edildi.
- ii. iMatrix-511 10 µg/ml olacak şekilde DPBS ile karıştırılarak petrilere kaplandı. 37°C'de 1 saat süreyle inkübe edildi.
- iii. Fibronektin 10 µg/ml olacak şekilde DPBS ile karıştırılarak petrilere kaplandı. 37 °C'de 3 saat süreyle inkübe edildi.
- iv. Matrigel matriksi 1:100 oranında soğuk DMEM/F12 ile buz üstünde karıştırılarak petrilere kaplandı. Hücreler ekilmeden önce 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- v. Geltrex matriksi 1:100 oranında soğuk DMEM/F12 ile buz üstünde karıştırılarak petrilere kaplandı. Hücreler ekilmeden önce 1 saat 37 °C'de inkübe edildi.

Matriksler kaplandıktan sonra yeniden ekim deneyinin ilk adımı hücre ayrıştırmasına geçildi. Yeniden ekim aşamasının ilk adımı olarak, kardiyomiyositlerin besiyerleri çekildi ve hücreler DPBS (-Ca²⁺, -Mg²⁺) ile 2 kez yıkandı, ardından DPBS

ile 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu adım tüm protokollerde uygulandı.

Enzimatik olarak hücreleri ayrıştırmak için Kolajenaz A+B, Kolajenaz II ve TrypLE Express recombinant enzimi, enzimatik olmayan yöntemde ise EDTA kullanıldı. Yeniden ekim işlemleri için hazırlanmış enzimlerin hazırlanışı ve kültürlere uygulanışı şu şekildedir;

- i. Kolajenaz A+B enzim karışımı, kardiyomiyosit besiyerine %7 Kolajenaz A, %7 Kolajenaz B, 100X DNase1 oranlarında karıştırılarak hazırlandı. Bu karışım, erken gün kardiyomiyositlere 20 dakika, geç gün kardiyomiyositlere 30 dakika süreyle 37°C'de uygulandı. Hücre kümelerini ayrıştırmak için hücreler bulundukları kapların içerisinde, 5 dakikada bir ışık mikroskopunda gözlemlenerek birkaç kez pipetlendi.
- ii. Kolajenaz II enzimi karışımı, %70 oranında önceden 37 °C'ye getirilmiş HBSS tampon çözeltide çözülerek hazırlandı. Bu enzim karışımı, erken gün kardiyomiyositlere 20 dakika, geç gün kardiyomiyositlere 30 dakika süreyle 37°C'de uygulanarak kümeleşmiş hücrelerin her 5 dakikada birkaç kez pipetlenerek ayrıştırılması sağlandı.
- iii. TrypLE enzimi önceden 37°C su banyosunda ısıtıldı ve hücreler üzerine eklendi. Erken gün kardiyomiyositlere 3 dakika, geç gün kardiyomiyositlere 7-10 dakika süreyle 37°C'de uygulanan enzim, hücreler adezyon özelliklerini kaybedince kaplardan çekilmeden üzerine FBS içeren besiyeri eklendi. Hücreler bulundukları kaplarda pipetlenerek kümeler ayrıştırıldı ve hücre süspansiyonları falkona toplandı.
- iv. Enzimatik olmayan yöntemde ise, EDTA ile ayrıştırma metodu uygulandı. Hücreler önce 1 kez PBS ile yıkandı daha sonra 1 kez EDTA ile yıkandı. Ardından hücrelere 1 ml EDTA eklendi ve erken gün kardiyomiyosit grubunda 3 dakika, geç gün kardiyomiyositlerde 7 dakika oda sıcaklığında beklendi. Hücreler besiyeri ile toplanarak kümeleşen yapıların çözülmesi için pipetlendi.

Tüm enzimatik ve enzimatik olmayan yollar ile ayrıştırılmış kardiyomiyosit hücre süspansiyonları 15 ml falkonlara toplanadı ve birkaç kez de falkonların içerisinde pipetlendi. Hücreler, 400xg'de 3 dakika santrifüj edildi. Pelletler, 10 µM Y-

27632 içeren önceden 37 °C su banyosunda ısıtılmış kardiyomiyosit besiyeri ile narince pipetlenerek açıldı ve çeşitli matrikslerle kaplanmış petrilere ekildi. Y-27632 molekülü 24 saati geçmeyecek zaman aralığında kültürlerden çekildi ve taze basiyeri eklendi. Kardiyomiyosit kültürlerinde birkaç gün içerisinde kasılmaların başladığı ve kültür şartlarının normale döndüğü gözlemlendi. Yeniden ekim işleminin verimini değerlendirmek amacıyla kültürlerde kardiyak hücre sayımı ve canlılık deneyi MTT analizi yapıldı.

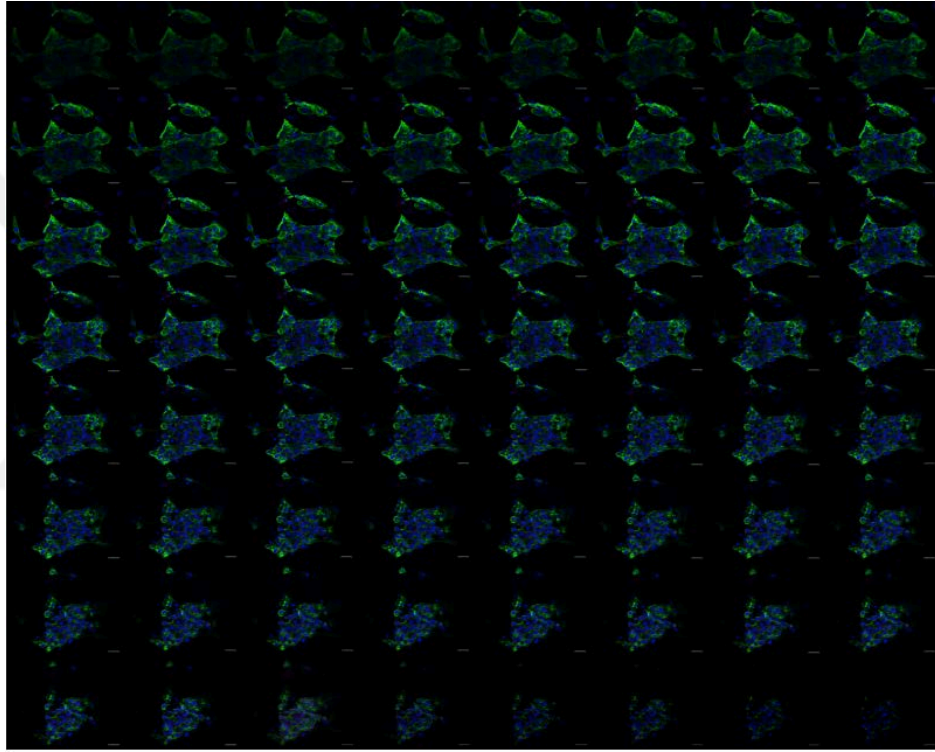
5.3.5 Hücre canlılık analizi

Yeniden ekilen kardiyomiyosit kültürlerinde uygulanmış ayrıştırma faktörleri özellikle enzimatik yollarda kullandığımız ajanların hücre canlılığına verdiği zararı değerlendirmek için kültürlerde Vybrant MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromür) test kiti kullanılarak canlılık analizi yapıldı. Bunun için 48 kuyucuklu hücre kaplarına her koşul için çift kuyucuk halinde ekilen kardiyomiyositlerin üzerine, yeniden ekim sonrası 3. günde 20µl MTT solüsyonu (5 mg/ml) ilave edildi ve 3 saat 37°C'de inkübe edildi. Işık mikroskobu altında kristalize yapılar gözlemlendikten sonra, süpernatant atıldı. Daha sonra kültüre 100 µl DMSO eklendi ve homojen mor renk elde edilinceye kadar pipetaj yapıldı. MTT solüsyonu eklenmemiş ve Triton-X kullanılarak hücre membranları patlatılarak canlılığı sonlandırılan hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. Hücrelerdeki renk değişimleri, SpectraMax i3 çok modlu mikropilaka okuyucu spektrofotometre cihazı ile 540 nm dalga boyunda ölçüldü ve MTT skorlarının sayısal değerleri kaydedilerek Excel grafiği şeklinde analiz edildi.

5.3.6 Kardiyomiyosit hücre skoru belirleme

Çeşitli enzim ve matriks kombinasyonları kullanılarak yeniden ekilen kardiyomiyosit kültürleri anti-CTNT antikoru ile immünboyaması yapıldı ve çekirdekleri DAPI ile işaretlendi. İmmünboyama sonrası her gruptan, 5-7 rastgele alan seçildi ve görüntüler, LSM800 konfokal floresan mikroskobunun ile Z-stack eklentisi kullanılarak kaydedildi (Şekil 5.3). Z-stack eklentisi, hücre tabakasının farklı odak bölgelerinden istenilen sayı ve aralıkta görüntüleri kaydederek analiz için büyük bir

alan derinliği sağlar (Şekil 5.3). Bu sayede, öncelikle tüm seçilen alanlardaki toplam hücre sayısını hesaplamak için DAPI⁺ hücreler sayıldı, ardından kültürlerdeki kardiyomiyosit hücrelerinin spesifik sayımını yapabilmek için tüm çift pozitif hücreler (DAPI⁺ ve CTNT⁺) sayılarak kaydedildi. Kardiyomiyosit skorunun yüzdesi (KM skoru), CTNT ve DAPI birlikte boyanmış kardiyomiyositlerin sayısının, DAPI etiketli toplam hücre sayısına bölünmesiyle belirlendi (192). Floresan etiketli hücreler, ImageJ yazılımı kullanılarak sayıldı.



Şekil 5.3 Yeniden ekim sonrası kardiyomiyosit hücrelerinin örnek birleşim görüntüsü. Konfokal floresan mikroskopunun 20X büyütmede Z-stack ayarlarında çekilmiştir.

5.3.7 THP-1 monosit hücre hattı kültürü ve makrofaj farklılaştırması

THP-1 hattı, bir çocukluk çağı akut monositik lösemi (M5 alt tipi) vakasının periferik kanından izole edilen ölümsüzleştirilmiş bir monosit hücre hattıdır (immortalized cell line). Genetik olarak tasarlanmış türevleri de dahil olmak üzere THP-1 hücreleri, çeşitli hastalık modellerinde araştırılan monosit ve monosit kökenli makrofajların yapısını ve işlevini araştırmak için sıklıkla kullanılan bir hücre hattıdır (193). Makrofaj hücreleri ile yapılacak deneylerin optimizasyonu için THP-1 monosit

hücre hattı kullanıldı ve bu hücrelerin çözülmesi, önceden oda sıcaklığına getirilmiş 10 ml RPMI1640 besiyeri içerisinde 15 ml falkonda gerçekleştirildi. Çözünmeden önce T25 flaska 5-8 ml THP-1 monosit besiyeri eklendi ve 15 dk 37 °C'de inkübe edildi. Hücreler 300xg'de 2 dakika santrifüj edildi ve 1 ml besiyeri ile sulandırılarak sayıldı. T25 flaska 0,2-4x10⁶/ml şeklinde ekildi. Flask inkübatöre dikey şekilde yerleştirildi. Hücrelerin morfolojileri her gün flaskın içerisinde 100 µl örnek alınarak kontrol edildi ve sayıldı. Hücreler ml başına en fazla 0,8-1x10⁶ olunca pasajlandı. Pasajlama işleminde, hücreler falkona toplandı ve taze besiyeri ile ekildi. Hücreler pasajlandıktan sonra kümeleşmemesi için narince ve iyice pipetlendi. T25'den T75 flaska çoğaltılan monositler makrofaj farklılaştırması için %0,2 konsantrasyonda hazırlanmış jelatin ile kaplanmış cam petrilere 0,5-1x10⁶/ml hücre olacak şekilde ekildi. Farklılaştırma için, protein kinaz C sinyal yolağında bir tümör aktive edici ajan Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) kimyasalı kullanıldı. 100 ng/ml PMA içeren THP-1 makrofaj farklılaştırma besiyeri ile ekilen hücreler 3 gün boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Hücreler her gün ışık mikroskopunda kontrol edildi, 3. gün sonunda besiyeri taze besiyeri ile değiştirildi. 6-7 gün sonunda tamamen farklılaşan makrofajlardan çeşitli karakterizasyon optimizasyonları yapıldı (194).

5.3.8 PBMC hücrelerinden CD14⁺ monositlerin ayrıştırılması

Makrofajlar, dolaşımda bulunan mononükleer hücrelerin (PBCM) yaklaşık %10'unu oluşturan monositlerden farklılaşırlar. İnsanlarda dolaşımdaki monositler yüzey belirteci CD14 proteinini ifade eder. Monosit spesifik CD14 yüzey proteinini tanımak üzere tasarlanmış MACS veya FACS yöntemleri ile insan kanındaki monositler %95 doğrulukla ayrıştırılabilmektedir. Bu sayede, CD14⁺ monositlerden saf bir makrofaj farklılaştırma kültürü elde edilebilmektedir (148). Bu sebeple, 10x10⁶ PBMC hücresi 80 µl MACS çözeltisi içerisinde süspanse edildi ve üzerine 20 µl CD14 ekli mikrobuncuk (microbead) antikor içeren solüsyondan eklendi. Karışım nazikçe pipetlendi ve 15 dakika boyunca +4°C'de inkübe edildi. Hücreler 2 ml MACS çözeltisi ile yıkandı ve 300xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatanı çekilen hücreler 500 µl MACS çözeltisi içerisinde çözüldü. MACS manyetik standına LS boyutlu kolon yerleştirildi ve kolonun filtresi 3 ml MACS çözeltisi ile ıslatıldı (Tablo 5.3). Tüm

çözeltinin filtreden geçmesi beklendi, ardından 500 µl volümündeki hücre süspansiyonu kolondan geçirilerek ayrılan hücrelerin kolon altına yerleştirilen falkona dolması beklendi. Kolon üç kez 3 ml MACS çözeltisi ile yıkandı. Filtreden geçen CD14⁻ hücreler falkonda toplandı ve içerisinden 5x10⁵ hücre ayrılarak RNA izolasyonu işlemine tabi tutuldu. Kolonun altına yeni bir falkon yerleştirildi ve 5 ml MACS çözeltisi filtreye eklenerek şırınga yardımıyla CD14⁺ hücreler filtreden aşağı doğru itilerek yeni falkonda toplandı (142). Seçilimi yapılan CD14⁺ monositler 10 µl Triphan mavi boyası ve 10 µl hücre karışımı ile sayıldı. 5x10⁵ CD14⁺ monosit ayrılarak RNA izolasyonu işlemine alındı. Geri kalan hücreler uygun sayılarda, makrofaj besiyeri ile uygun kaplara ekilerek farklılaştırıldı (Tablo 5.3).

5.3.9 CD14⁺ monositlerin makrofajlara farklılaştırılması

Literatürde *in vitro* makrofaj farklılaştırmaları, insan kanından izole edilmiş CD14⁺ monositlere makrofaj spesifik büyüme faktörleri uygulanarak yapılmaktadır (141, 143, 195, 196). Bu tez çalışmasında, makrofaj farklılaştırılmasında öncelikle besiyeri optimizasyonu, sonrasında hücre ekiminde kullanılacak monositlerin sayı optimizasyonu yapıldı. Sağlıklı bireyden saflaştırılmış monositlerin kullanıldığı bu deneylerde, besiyeri optimizasyonu için insan serumu ve yenidoğan buzağı serumu (NBCS) kullanıldı. Hücre sayısı optimizasyonu için, kültür kaplarına cm²'ye 10x10³, 30x10³, 60x10³ ve 100x10³ sayılarında monosit ekimi yapıldı. Sekizinci günün sonunda kültürler makrofaj morfolojisi açısından incelendi.

Optimizasyonlar tamamlandıktan sonra sağlıklı bireylerin ve *SCN5A*^{delKPQ/+} mutasyonu taşıyan konjenital aritmi hastalarının venöz kan örneklerinden MACS yöntemi ile izole edilen CD14⁺ monositler, sayım sonrasında 6 kuyucuklu hücre kaplarına cm²'ye optimize edilmiş 30x10³ monosit hücresi gelecek şekilde NBCS içeren makrofaj besiyeri ile ekildi. CD14⁺ monositlerin makrofaja farklılaşmasını indüklemek için, monosit ekimi aşamasında 50 ng/ml M-CSF ve 25 ng/ml GM-CSF büyüme faktörü eklendi ve 37°C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edildi (Tablo 5.3). Hücrelerin besiyeri, taze olarak eklenen faktör varlığında 2-3 günde bir değiştirildi. Yedinci gün sonunda farklılaşma kültürlerindeki makrofajlar, ışık mikroskobu ile

morfolojik olarak seçilmeye başlandı. Sekizinci günden sonra makrofaj farklılaşması tamamlanınca serum oranı %5'e düşürüldü.

5.3.10 Makrofaj ve kardiyomiyosit kokültürlerinin oluşturulması

Bu tez kapsamında kokültürlerin kontrol gruplarını oluşturan tekli kardiyomiyosit kültürü oluşturmak üzere, hücreler, '5.2.4 Kardiyomiyositlerde yeniden ekim protokolleri' bölümünde detaylandırıldığı gibi TrypLE rekombinant enzimi kullanılarak bulundukları kaptan kaldırıldı ve kardiyomiyosit besiyeri ile fibronektin kaplanmış cam veya plastik petrilere ekildi. Tekli kardiyomiyosit kültürleri oluştururken eş zamanlı olarak kokültürler de oluşturuldu. Bu sebeple kardiyomiyositler, hücre sayımı sonrası farklılaşması tamamlanmış 8-12. günler arası makrofaj kültürlerinin üzerine belirli oranlarda (x: kardiyomiyosit, y: makrofaj olacak şekilde; x:y, 1:3) ekildi. Besiyeri kokültür besiyeri olarak değiştirildi (Tablo 5.3). Kokültürler, yeniden ekim sonrası 1 hafta boyunca kültür şartlarının oturması için ışık mikroskobu ile gözlemlendi ve kültürler en çok 14 gün sürdürüldü. Oluşturulan kokültürlerden ve tekli kültürlerden eş zamanlı olarak kantitatif RT-PZR, immünohistokimyasal boyama ve fonksiyonel kasılma analizleri gerçekleştirildi.

Kokültürlerde oluşturulan deneysel gruplar;

- i. **Kokültür grubu 1:** Sağlıklı bireylere ait kardiyomiyositler ile sağlıklı bireylere ait makrofaj kokültürleri,
- ii. **Kokültür grubu 2:** Sağlıklı bireylere ait kardiyomiyositler ile *SCN5A^{delKPQ/+}* mutasyonu taşıyan UQTS3/Brugada sendromu hastalarına ait makrofaj kokültürleri,
- iii. **Kokültür grubu 3:** *SCN5A^{F1465L/+}* mutasyonu taşıyan ventriküler taşikardi hastası kökenli kardiyomiyositler ile sağlıklı bireylere ait makrofaj kokültürleri,
- iv. **Kokültür grubu 4:** *SCN5A^{F1465L/+}* mutasyonu taşıyan ventriküler taşikardi hastası kökenli kardiyomiyositler ile *SCN5A^{delKPQ/+}* mutasyonu taşıyan UQTS3/Brugada sendromu hastalarına ait makrofaj kokültürlerini içermektedir.

5.3.11 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope), odaklanmış bir elektron demeti ile örneğin yüzeyini tarayarak görüntü elde eden bir elektron mikroskobu çeşididir. Elektronlar hücredeki atomlarla etkileşerek hücre yüzeyindeki topografi ve kompozisyon bilgileri içeren farklı sinyaller üretir ve ekrana örneğin büyütülmüş görüntüsünü oluşturur. SEM yöntemi, makrofaj kültürlerinin karakterizasyonlarında olgunlaşma, aktivasyon ve fagositoz sırasındaki yüzey morfolojisini ve özelliklerini değerlendirmek için sıklıkla uygulanmaktadır. Bu tez çalışmasında tekli makrofaj kültürlerinde ve Grup 1 kokültürdeki hücre etkileşimlerini incelemek amacıyla SEM protokolü uygulandı. Hücre ekiminden önce petriler, elektron mikroskopi tekniği için dizayn edilmiş ACE200 vakumlu kaplama cihazında 20 saniye boyunca altın-paladyum (Au-Pd) ile kaplandı. Petriler daha sonra hücre tipine uygun matriks ile kaplanarak hücre ekimi gerçekleştirildi. SEM analizi için kültürlerdeki kardiyomiyositler %2,5 Glutaraldehit ve %2 PFA ile 4 °C'de 30 dakika boyunca fiksleildi ve oda sıcaklığında %30-50-70-80-96-100 şeklinde artan etanol serileri ile her aşama 10 dakika olacak şekilde yıkandı. Kültürlerdeki kardiyomiyositlerin bulunduğu alanların tepsitini kolaylaştırmak amacıyla, hücrelerin anti-CTNT birincil ve AF-488 ikincil antikorları kullanılarak 3 saat oda sıcaklığında immünboyaması yapıldı. CTNT⁺ bölgeler LSM800 konfokal floresan mikroskobunda kontrol edilerek işaretlendi ve petrilere tüm sıvı çekilerek, 2-3 gün oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Tamamen kuruyan hücreler, SEM analizinden önce kaplama cihazında 20 saniye boyunca Au-Pd ile yeniden kaplandı. Kültürlerdeki detaylı hücre görüntüleri, GeminiSEM 500 mikroskobu ile kaydedildi. Öncesinde işaretlenen CTNT⁺ bölgelerdeki makrofaj etkileşimleri detaylıca görüntülendi. SEM görüntüleme, kültürlerde 2 kez tekrarlandı.

5.3.12 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

Geçirimli elektron mikroskobu (Transmission Electron Microscope) çok ince bir örnek içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibine dayanır. Geçirimli elektron mikroskobu, optik mikroskoba kıyasla çok daha küçük ayrıntıları görmeye olanak verir. Öncelikle makrofaj kültürü bir gece boyunca +4

°C'de 0,1 M kakodilat tamponu (pH: 7.4) içinde %2 PFA ve %2,5 gluteraldehit içeren 1 ml Karnovsky fiksatif ile sabitlendi. Hücreler daha sonra üç kez 1 ml 0,1 M kakodilat tamponu ile yıkandı ve 0,1 M kakodilat tamponu içinde 1 ml %1 ozmiyum tetraoksit içinde +4 °C'de bir saat süreyle inkübe edildi. Hücreler, %50-%100 arasında artan konsantrasyonlarda etanol gradyanı ile dehidrasyon işleminden geçirildi. Reçine içine gömülen tüm numuneler, polimerizasyonun tamamlanmasını sağlamak için silikon kalıplara aktarıldı. Tüm bloklar, bir ultramikrotom kullanılarak 60 nm kalınlıkta kesitler şeklinde kesildi ve grid üzerine yerleştirildi.

5.3.13 Makrofajlarda fagositoz analizi

Makrofajlar ve nötrofillerin dahil olduğu fagositik hücrelerin primer fonksiyonu, yabancı moleküllerin tanınması, fagosit edilmesi ve yok edilmesidir. Literatürde makrofaj kültürlerinin karakterize edilmesinde kullanılan en klasik yöntem fagositoz analizidir. Fagositoz deneylerinde, immunoglobulin G (IgG) kaplı lateks mikrobuncuklar (microbead), floresan boya işaretli *E. coli* bakterisi veya floresan boya işaretli bakteriyel moleküller kullanılmaktadır (124, 197, 198). Bununla birlikte, floresan boya işaretli dekstran moleküller de farklılaştırılan makrofajların fagositoz kapasitesini değerlendirmek için sıklıkla kullanılmaktadır (199). Dekstran, tekrarlayan glukoz alt birimlerinden oluşan biyolojik olarak parçalanabilen nötr bir bakteriyel ekzopolisakkarittir ve bakteriyel kontaminasyona sebebiyet vermemesi sebebiyle hücre kültürü gibi steril ortamlarda güvenilir bir şekilde kullanılabilir. Bu tez çalışmasında, makrofaj kültürlerinin farklılaşmasını kalitatif olarak gözlemlemek amacıyla kültürler farklılaşmanın 8. gününde fagositoz deneyi uygulandı. Makrofaj kültürlerinin besiyeri, karanlıkta hazırlanan 200 µg/ml konsantrasyonunda 10 kDa boyutunda RITC (Rodamin-B izotiosiyanat) işaretli dekstran molekülü içeren taze besiyeri ile değiştirildi ve hücreler gece boyunca 37°C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edildi. Negatif kontrol olarak uPKH-kökenli kardiyomiyosit kültürleri kullanıldı. RITC-dekstran molekülünü fagosit eden hücrelerin varlığı LSM800 Konfokal floresan mikroskopunda 570/595 nm eksitasyon/emisyon dalga boyu ışması altında incelendi (199, 200). Makrofajlardaki RITC yoğunluğunun kantitatif analizi ImageJ

programı ile gerçekleştirildi. Makrofaj kültürlerine aynı gün içerisinde canlı lizozom boyaması uygulandı.

5.3.14 Canlı lizozom boyaması

Fagositoz deneyinden sonra makrofaj hücrelerinin RITC-dekstran içeren fagolizozom yapılarının lizozomik karakterizasyonlarını yapmak amacıyla, kültürle canlı lizozom boyaması uygulandı. Bu bağlamda, hücre kaplarına karanlıkta hazırlanan 75 nM konsantrasyonda LysoTracker™ Green DND-26 lizozom işaretleyicisi eklendi. Hücreler 1,5 saat 37°C, %5 CO₂ ortamında inkübe edildi ve besiyeri taze makrofaj besiyeri ile değiştirildi. Hücrelerde lizozom organeli görüntüleri, LSM800 Konfokal floresan mikroskobu 504/511 nm eksitasyon/emisyon ayarlarında kaydedildi (194). RITC⁺ bölgelerle çakışan lizozomik lokasyonlar ImageJ programı ile analiz edildi.

5.3.15 Akım sitometrisi

Akım sitometrisi (flow cytometry), sıvı bir sistem içerisinde süspansiyon haldeki hücrelerin veya partiküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini kalitatif ve kantitatif olarak analiz edebilen bir yöntemdir. Akım sitometrisi cihazı ile çok sayıda tekli hücrenin kısa sürede analizi yapılabilmektedir. Bu yöntem, ölü ve canlı hücre ayrımının yapılabilmesine, az sayıdaki hedef hücrenin geniş hücre popülasyonu içerisinde saptanabilmesine ve seçiliminin yapılabilmesine olanak sağlar (201). Bu tez çalışmasında, kardiyomiyosit ve makrofaj kültürlerinin farklılaşma veriminde sırasıyla CTNT⁺ ve CD11B⁺ hücre yüzdesini belirlemek amacıyla akım sitometrisi metodundan faydalanıldı. Makrofaj kültürleri önce DPBS ile, ardından 10 mM EDTA solüsyonu ile yıkandı ve 10 mM EDTA solüsyonu içerisinde 20 dakika 37 °C’de inkübe edildi. EDTA solüsyonu içerisindeyken hücreler narince pipetlenerek bulundukları kaptan kaldırıldı ve MACS solüsyonu yardımıyla FACS işlemine özel polistren tüplerde toplandı (Tablo 5.3). Hücreler 400xg’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant çekildi ve hücreler 1 ml MACS solüsyonu ile polistren tüplerine 40 µm naylon filtreden geçirilerek toplandı. Makrofajların Fc reseptörlerinin, spesifik olmayan bağlantılara yol açarak yalancı pozitif sonuç vermesini önlemek amacıyla hücre karışımına 1:250

oranında Fc reseptör bloklayıcı (anti-CD16/CD32) antikor eklendi. Hücreler 15 dakika oda sıcaklığında bloklandıktan sonra 1 kez MACS buffer ile yıkandı ve İşaretlenmemiş (Unstained), İzotip (Isotype) ve İşaretli (Stained) olmak üzere üç gruba ayrıldı. İşaretlenmemiş tüp tüm süreçlerde 4 °C’de beklerken, izotip tüpüne 1:500 oranlarında IgG1 kappa-FITC izotip antikor, antikor işaretli tüpe ise IgG1 kappa-CD11B-FITC antikor eklendi. İzotip kontrol grubuna işaretli grup ile aynı sayıda hücre, aynı konsantrasyonda izotip antikor eklendi. Tüpler 15 dakika 23 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde 4 °C’de inkübe edildi. Son olarak 350 µl MACS solüsyonunda çözölen pellet içerisine 2 µg/ml canlılık boyası propidium iyodür (PI) eklenerek hücreler FACSymphony A1 akım sitometrisi cihazında analize alındı. Kantitatif değerler ve grafikler FlowJo v10,6.1 yazılımı ile analiz edildi. Kardiyomiyosit kültürleri, yeniden ekim bölümünde anlatıldığı gibi TrypLE enzimi ile ayrıştırılarak 1:250 dilüsyonlu anti-CTNT antikorunu içeren MACS solüsyonu ile muamele edildi.

5.3.16 Total RNA İzolasyonu

Kültürde bulunan hücreler DPBS (-Ca⁺², -Mg⁺²) ile yıkandı. Hücre kabına 200 µl DPBS ve 400 µl kit içeriğinde yer alan lizis tamponu eklendi ve hücre kazıyıcısı kullanılarak hücreler 1,5 ml ependorfa toplandı. 15 saniye vortekslenen hücre süspansiyonu RNA izolasyon kolonuna aktarıldı ve 15 saniye 8000xg’de santrifüj edildi. Kolon üzerine 10 µl DNaseI enzimi ve 90 µl DNase çözeltisi karışımı eklendi, 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Filtrenin üzerine 500 µl yıkama çözeltisi-I eklendi ve kolon 15 saniye 8000xg’de santrifüj edildi. Filtrenin üzerine 500 µl kit içeriğinde yer alan yıkama çözeltisi-II eklendi ve kolon 15 saniye 8000xg’de santrifüj edildi. İkinci kez 200 µl kit içeriğinde yer alan yıkama çözeltisi-II eklendi ve kolon 2 dakika 13000xg’de santrifüj edildi. Filtreye 500 µl %70:30’luk taze hazırlanmış etanol-su karışımı eklendi ve 1 dakika 8000xg’de santrifüj edildi. Ardından kolon bir kez de 13000xg’de üzerine bir solüsyon eklenmeden spin edildi. Bu aşamadan sonra RNA’nın toplanacağı RNase içermeyen 1,5 ml ependorf tüp üzerine alınan kolonun tam ortasına 50 µl kit içeriğinde yer alan elüsyon tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra tüp 1 dakika 8000xg’de santrifüj edildi. İzole edilen

RNA hızlıca buz üzerine alındı, konsantrasyon ve kalite değerleri Nanodrop cihazı ile ölçülen RNA örnekleri -80 °C’de muhafaza edildi.

5.3.17 Komplementer DNA sentezi

İzole edilen RNA’ların konsantrasyon ölçümleri yapıldıktan sonra, totalde 50-200 ng RNA örneğinden komplementer DNA (cDNA) sentezi yapıldı. Tablo 5.13’te verilen oranlara göre hazırlanan karışım tüplere dağıtıldı ve termal ısıtıcıda 5 dk 25°C, 30 dk 42°C ve 5 dk 85°C’ye ayarlanan programda cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 5.13 Komplementer DNA sentezi reaksiyon bileşenleri

İçerik	Reaksiyon için gerekli hacim (µl)
5X Reaksiyon karışımı	4 µl
Tersine (reverse) transkriptaz enzimi	1 µl
RNA örneği	50-200 ng olacak kadar
Nükleaz içermeyen dH ₂ O	-
Toplam Hacim	20 µl

5.3.18 Kantitatif tersine transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (Kantitatif RT-PZR)

Kantitatif RT-PZR reaksiyonu, 1:3-1:10 sulandırılan cDNA örnekleri ve uygun Tablo 5.14’te belirtilen primerler varlığında ve Tablo 5.15’te detaylandırıldığı şekilde gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı; 95 °C 3 dakika, 45 döngü 95°C 10 sn, 58°C 30 sn ve 72°C 30 sn, 65°C 5 sn şeklinde ayarlandı. Kantitatif RT-PZR reaksiyonunda relatif gen ekspresyon seviyeleri *GAPDH* genine göre analiz edildi. MACS işlemi sonucu ayrıştırılmış CD14⁺ monositler ve makrofaj hücrelerinin gen ifadeleri, PBMC tabakasından geriye kalan CD14⁻ monositlerdeki ifadelerine göre oranlandı CD14⁻ monositlerdeki gen ifadeleri 1 kabul edildi.

Tablo 5.14 RT-PZR’de kullanılan primer dizileri.

	Gen ismi	Primer dizisi
İnsan Kardiyomiyosit primerleri	CTNT-F	TTCACCAAAGATCTGCTCCTCGCT
	CTNT-R	TTATTACTGGTGTGGAGTGGGTGTGG
	SCN5A-F	GAGCTCTGTCACGATTTGAGG
	SCN5A-R	GAAGATGAGGCAGACGAGGA
	MLC2V-F	CAGAACAGGGATGGCTTCAT
	MLC2V-R	GGTCCGCTCCCTTAAGTTTC
	MYH6-F	GGGATAACCAGGGGAAGCACCAAGA
	MYH6-R	TGCCTCCCTCCCGGGACAAAAT
	MYH7-F	TTGAGTAGCCCAGGCACAGCCAT
	MYH7-R	TGCCACCCTCTCGAGACACGAT
İnsan Makrofaj primerleri	CD14-F	AAGACTTATCGACCATGGAGC
	CD14-R	GCATGGATCTCCACCTCTAC
	CD68-F	GGGGCATCTCTGTACTGAACC
	CD68-R	AATGTCCACTGTGCTGCGTG
	CD11B-F	ACAGCCTTGACCTTATGTCATGG
	CD11B-R	CCTGTGCTGTAGTCGCACT
	IL-1 β -F	GACACATGGGATAACGAGGC
	IL-1 β -R	GACATGGAGAACACCACTTG
	CD86-F	TGGAACCAACACAATGGAGA
	CD86-R	AAAAAGGTTGCCAGGAAGT
	CD206-F	CCTACTGGACACCAGGCAAT
	CD206-R	CCCAGTCCGTTTTTGATGGC
	IL-10-F	TCAAGGCGCATGTGAACTCC
	IL-10-R	ATGTCAAACCTCACTCATGGCT
	STAT-6-F	TACTACCCCCACAGACCTGC
	STAT-6-R	CATGTTGGGGTATGTATCTCAG
	TBET-F	CAAGCAGGGACGGCGGATGT
	TBET-R	TTGGACGCCCCCTTGTTGTTTG
Housekeeping primeri	GAPDH-F	CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTATTG
	GAPDH-R	GCTCCTGAAGATGGTGATGGGATTT

Tablo 5.15 Kantitatif RT-PZR reaksiyonu bileşenleri

Reaksiyon içeriği	Miktar
Syber Mix karışımı	5 μ l
5 μ M Forward primer	0,5 μ l
5 μ M Reverse primer	0,5 μ l
cDNA	1 μ l
dH ₂ O	3 μ l
Toplam Hacim	10 μ l

5.3.19 İmmünohistokimyasal boyama

Bu tez çalışmasında, makrofaj ve kardiyomiyosit hücrelerindeki hedef proteinleri varlığı ve hücre içi lokalizasyonunu belirlemek amacıyla kalitatif bir moleküler analiz yöntemi olarak immünohistokimyasal boyamalardan faydalanılmıştır. *İn vitro* kültür edilen hücrelerin besiyeri çekilip 3 kez PBS ile yıkanarak besiyeri bileşenlerinin tamamen ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Kültürlere, hücrelerin yüzeyini kaplayacak kadar önceden oda sıcaklığına getirilmiş %4 PFA eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilerek hücreler fikse edildi. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra Tablo 5.6'da belirtilen içerikte hazırlanmış bloklama solüsyonu ile 45 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde muamele edildi. Hedef proteinleri işaretlemek amacıyla Tablo 5.7'te belirtilen konsantrasyonlarda primer antikorlar Tablo 5.6'da belirtilen içerikte hazırlanmış dilüsyon solüsyonu içerisinde hücre kaplarına eklendi. İnkübasyon, +4°C'de 12-16 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirildi. Hücreler ertesi gün 1 kez PBS ile yıkandıktan sonra floresan görüntü alabilmek için kullanılan primer antikorlara bağlanabilen floresan özellikli sekonder antikorlar kullanıldı. Tablo 5.7'te belirtilen konsantrasyonlarda sekonder antikorlar dilüsyon solüsyonu içerisinde petriye eklenerek, ışığa duyarlı oldukları için karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirildi. 1 saat sonunda floresan boyama sonrası hücreler üç kez %0,2 Tween-20 içeren PBS ile yıkanarak bağlanmamış antikorlar ortamdan uzaklaştırıldı. Görüntüleme öncesi hücrelere çekirdek boyası DAPI eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Örneğin kurumaması ve kontamine olmaması için kaplara %0,1'lik Sodyum azid içeren PBS eklendi ve hücreler Z-stack ayarlarında LSM800 konfokal floresan mikroskobu ile görüntülendi.

5.3.20 Hücre içi Ca⁺² görüntüleme

Hücre içi Ca⁺² iyonlarına bağlanarak iyonları floresan boyayla işaretleyen Fluo4-AM kimyasalı sayesinde, tekli kardiyomiyosit kültürleri ve kokültürlerde hücreler arası iyon geçişini ve hücre içi iyon kinetiğini konfokal floresan mikroskobunda gözlemledik. Fluo-4-AM boyaması amacıyla hücrelerin besiyeri çekildi ve 990 µl kardiyomiyosit besiyeri içerisine 5 µl (5 mM) Fluo-4-AM boyası ve 5 µl (5 mM) Pluronic asit ile hazırlanan karışım ile hücreler oda sıcaklığında 30 dakika inkübe

edildi. İnkübasyon sonrasında hücreler yıkanarak kardiyomiyosit besiyeri içinde 15 dakika 37°C’de bekletildi. İnkübasyon sonrasında örnekler, homeostazı sürdürmek için %5 CO₂ ve 37 °C'ye ayarlanan Spinning Disk Konfokal Mikroskopunun inkübatör eklentisine yerleştirildi. Her petriden en az 15-20 rastgele alandan, 40X büyütmede ve 488 nm dalga boyunda videolar kaydedildi. Videoların çekim ayarları saniye başına düşen kare sayısı FPS=15 (FPS: Frame per second) olacak şekilde ayarlandı ve Ca⁺² değişimleri 30 saniye boyunca kaydedildi. Videolardaki spontan aktivitelerin oluşturduğu renk/piksel değişimleri, Fiji-ImageJ programının ROI manager eklentisi ile sayısal verilere çevrilerek Excel programına aktarıldı ve burada kantitatif analizi yapılarak grafikleri oluşturuldu (87).

5.3.21 Video tabanlı fonksiyonel kasılma analizi MUSCLEMOTION

Tekli veya kokültürlerdeki uPKH-temelli kardiyomiyositlerin kasılma paterni, 2018 yılında literatüre giren MUSCLEMOTION isimli yöntem ile analiz edildi. Bu yöntem, kültürlerin ışık mikroskobu altında istenilen magnifikasyonda kayıt edilen ve FPS değeri en az 100 olacak şekilde kaydedilmiş videolarından, piksel değişimi analizi ile yapılmaktadır (89). Detaylı ve güvenilir bir fonksiyonel kasılma analizi olan MUSCLEMOTION ile, aritmi varlığı veya senkronize atım ve dakika başına atım sayısı (beating per minute, BPM) gibi parametreler değerlendirilebilmektedir. Her gruptan en az 5 alanın videosu, ışık mikroskobuna monte edilen akıllı telefonun 120 FPS yavaş çekim ayarlarını kullanarak 30 saniye boyunca kaydedildi. Sağlıklı ve hasta kökenli kardiyomiyositlerin tekli kültürlerinde ve kokültürlerdeki kardiyak makrofajların varlığında atım hızlarının ve paterninin değişimi, ve değişimin ne yönde (artış/azalış veya senkronizasyon durumu) olduğu ImageJ programına kurulan MUSCLEMOTION makrosu ile analiz edildi. MUSCLEMOTION makrosunun verdiği sayısal değerler Excel programına aktarıldı ve burada kantitatif analizi yapılarak atım grafikleri a.u. (arbitrary unit) biriminden oluşturuldu. Gruplardaki kardiyomiyositlerin BPM cinsinden hesaplanmış kasılma frekansları istatistiksel analize alındı.

5.3.22 Ritim Analizi

Kardiyomiyosit hücrelerinin spontan kasılmalarının ritmi, hem monokültürlerde hem de kokültürlerde video tabanlı kasılma analizi ile değerlendirildi. Fonksiyonel kasılma analizi yoluyla oluşturulan BPM grafikleri kullanılarak, her ardışık kasılmanın simgelediği tepelerin karşılık geldiği aralık (PPI: peak-to-peak interval) değerleri, iki bitişik tepe arasındaki süre ölçülerek saniye cinsinden hesaplandı ve düz veya eğri çizgiler olarak çizildi (266). Monokültürler ve kokültürlerdeki kardiyomiyositlerin ritm analizlerinin yüzdesel değerleri, PPI değerlerine dayalı olarak hesaplandı ve analiz edildi.

5.3.23 Hızlandırılmış çekim ile görüntüleme (Time-lapse)

Kokültürlerde kardiyomiyosit ve makrofajların fiziksel bağlantılarını incelemek amacıyla, 24 saatlik hızlandırılmış çekim uygulanmış rastgele beş alandan alınan aydınlık alan görüntüleri Cell Observer Spinning Disk mikroskobu ile kaydedildi. Homeostazı sürdürmek için %5 CO₂ ve 37 °C'ye ayarlanan mikroskobun inkübatör eklentisine yerleştirilen kültürlerde görüntüler yaklaşık 24 saat boyunca kaydedildi ve birleştirilerek hızlandırılmış video oluşturuldu. Bu videolarda kardiyomiyosit ve makrofajların fiziksel teması incelenerek hücrel davranışları analiz edildi.

5.4 İstatistiksel Analizler

Konfokal floresan mikroskobu ve ışık mikroskobu ile çekilmiş fotoğraflar ImageJ v1.52 programı ile .jpeg ve ardından .tiff uzantılı görüntülere çevrilerek kaydedildi. Kardiyomiyosit kültürlerinde hücre içi Ca²⁺ görüntüleme profilleri ImageJ programı içerisinde ROI (region of interest) manager uzantısı ile yapıldı ve veriler a.u. (arbitrary unit) cinsinden kaydedildi. Dakikada hesaplanan atım sayıları (beats per minute: BPM) ImageJ programı içerisine yüklenen MUSCLEMOTION makrosu ile belirlendi. Korelasyon analizi ImageJ programı ile yapıldı. Tüm sayısal veriler Windows Excel Workbook programlarında veya Apple uyumlu GraphPad PRISM 8.0 yazılımında analiz edildi ve grafikleri oluşturuldu. Deneysel basamakları içeren şekiller biorender.com internet sitesi kullanılarak oluşturuldu. Tüm sayılar verilerin

gruplar arasındaki anlamlı fark analizi için yapılan istatistiksel analizler için, GraphPad PRISM 8.0 yazılımı kullanıldı. Verilerin kendi aralarında normal dağılımlı olup olmadığı belirlendi. Normal dağılımlı ikili grup karşılaştırmaları için Student *t*-test, normal dağılım göstermeyen ikili grup karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Normal dağılımlı çoklu karşılaştırmalar için One-Way ANOVA (tek yönlü varyans analizi) yapıldı, çoklu karşılaştırmalarda normal dağılım yok ise Kruskal Wallis testi uygulandı. İleri anlamlılık (*post-hoc*) testleri için ise Tukey veya Tamhane analizleri kullanıldı. Değerler, ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edildi. Sonuçların anlamlılık değeri; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ şeklinde belirlendi. Bu değerler %95 güven aralığında (Confidential Interval:CI) değerlendirildi.

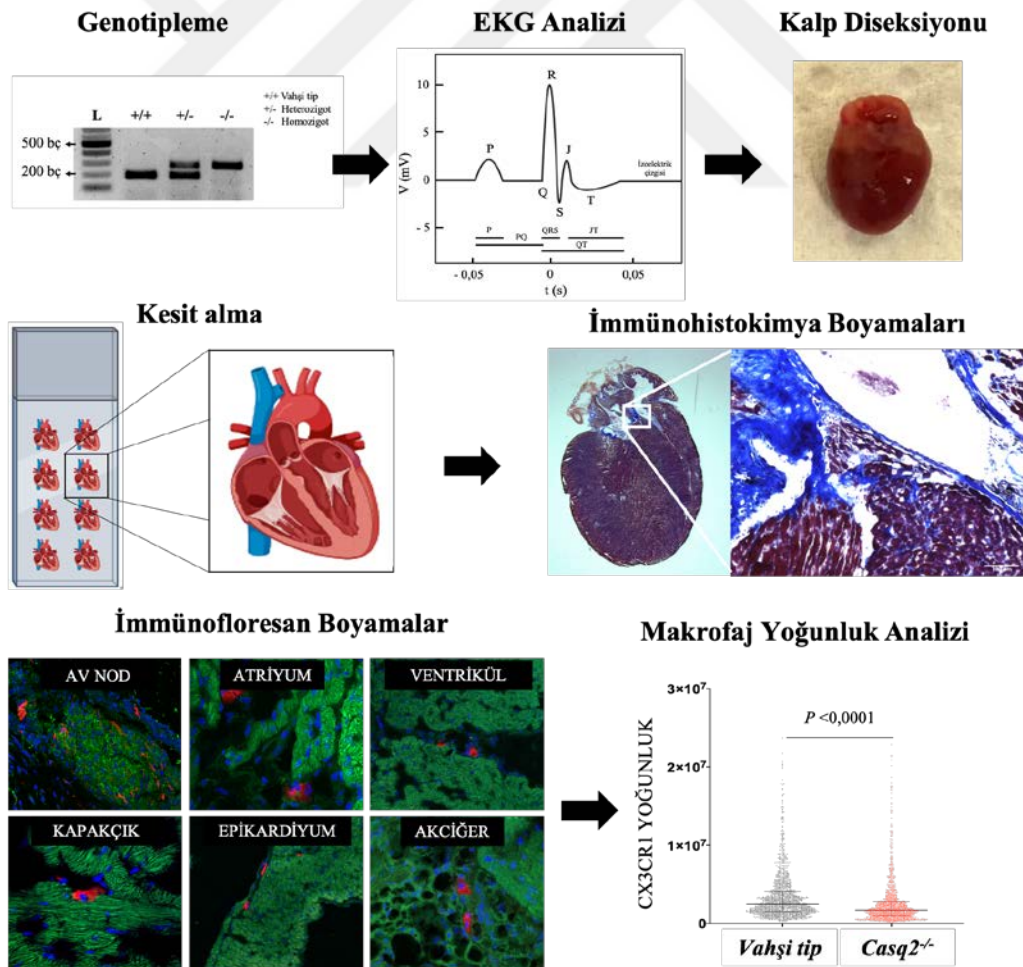


6. BULGULAR

Sağlıklı ve konjenital aritmi hastalık modellerinde kardiyomiyositler ve makrofajların etkileşimlerinin incelendiği bu tez çalışmasında, vahşi tip ve katekolaminerjik polimorfik ventriküler taşikardi (CPVT) hastalık modeli transgenik fare soyunda kardiyak makrofajların yerleşim ve yoğunlukları *ex vivo* olarak incelendi. Bununla birlikte, sağlıklı ve hasta bireylerden elde edilen kardiyomiyosit ve makrofaj hücreleri karakterize edildikten sonra birlikte ekildikleri kokültürlerde, hücreler arasındaki morfolojik, moleküler ve fonksiyonel etkileşimler *in vitro* olarak incelendi.

6.1 Ex Vivo Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

Tez çalışması süresince izlenen *ex vivo* deney basamakları Şekil 6.1’de özetlenmiştir.

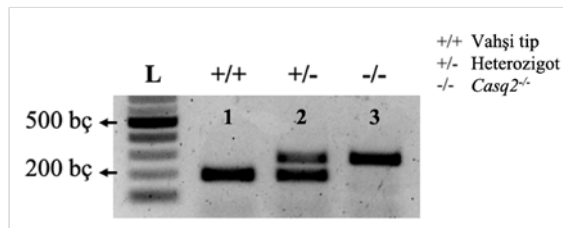


Şekil 6.1 Tez çalışmasının *ex vivo* deney dizaynının grafiksel özeti.

İlk aşamada tez kapsamında kullanılacak vahşi tip ve transgenik fare soyundan üretilen fareler genotiplendi, ardından hastalık fenotipini doğrulamak için EKG analizleri gerçekleştirildi. Kalp diseksiyonu ve doku kesiti alınmasından sonra bu dokularda çeşitli immünohistokimyasal boyamalar ile kardiyak makrofajların yerleşim ve yoğunluklarının kalitatif ve kantitatif analizleri yapıldı (Şekil 6.1).

6.1.1 Vahşi tip ve transgenik farelerin çoğaltılması ve genotiplemesi

Bu tez çalışmasının *ex vivo* deneylerinde, literatürde *Casq2*^{-/-} genotipinde hastalık modeli gösteren transgenik fare soyunun homozigot alleli taşıyan fareler ve kontrol grubu olarak C57BL/6 vahşi tip fareler kullanıldı. *Casq2*^{-/-} farelerde, kardiyomiyosit kasılması sırasında Ca²⁺ salınımından sorumlu mekanizmada görev alan kalsekuestrin proteinini kodlayan *Casq2* geninin başlangıç (promoter) bölgesi ve ilk ekzonunun silinmesiyle 1 kilobaz büyüklüğünde delesyon oluşturduğu raporlanmıştır (62). Böylece *Casq2* geninin proteine kodlanması engellenmiş olup CPVT hastalık modeli transgenik fare soyu elde edilmiştir (62, 66). Öncelikle, *Casq2* mutasyonu taşıyan fare soyunun genotiplenmesi, 21-30 günlük yavrulardan alınan kulak dokularından izole edilen DNA örnekleri kullanılarak PZR işlemi ile yapıldı. Fare soyu için 253 bç (baz çifti) vahşi tip alleli belirlerken, 280 bç mutant allelin varlığını gösterdi. Her iki alleli bulunan gruplar heterozigot olarak belirlendi (Şekil 6.2).

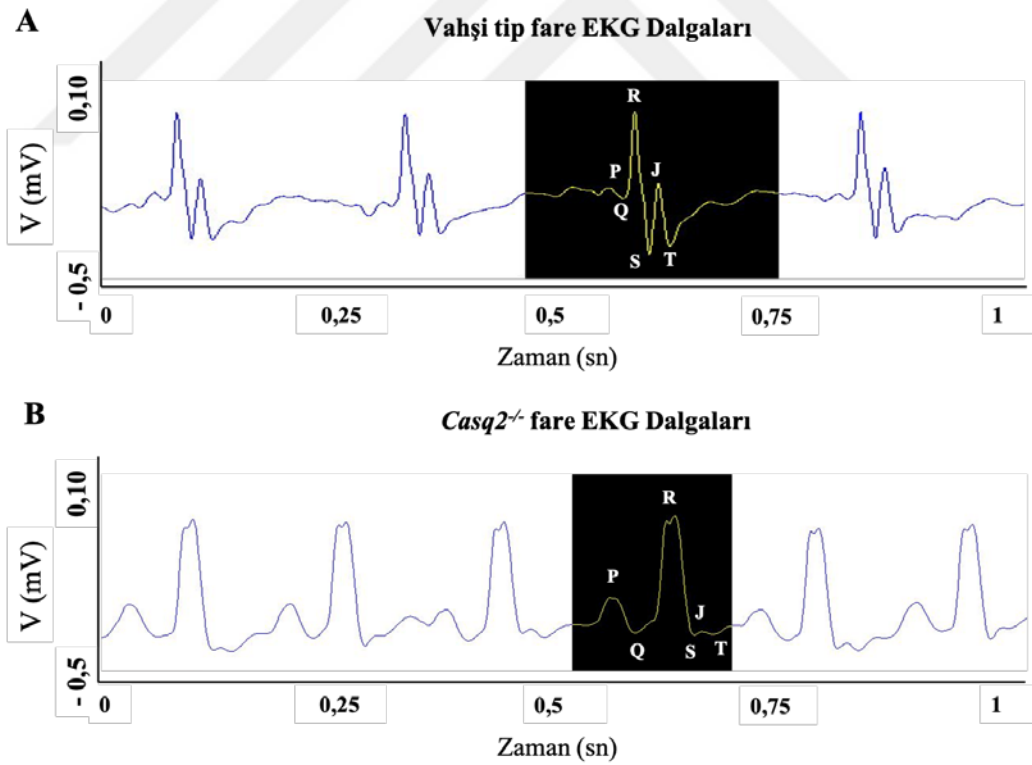


Şekil 6.2 Transgenik farelerin genotip analizi. 1: Vahşi tip, 2: Heterozigot, 3: Homozigot mutant örnek (*Casq2*^{-/-}). bç: baz çifti. L: Ladder.

6.1.2 Vahşi tip ve transgenik fare soylarında EKG ölçümleri

Farelerin genotipleri doğrulandıktan sonra hastalık fenotiplerini doğrulamak amacıyla, 6-10 haftalık vahşi tip ve *Casq2*^{-/-} farelerden elektrokardiyografi (EKG)

kayıtları alınarak Biopac Student Lab programıyla grafikler oluşturuldu (Şekil 6.3). EKG grafiklerinde belirlenen dalga ve intervaller, standart EKG dalga ve intervalleri referans alınarak belirlendi (Şekil 4.7). Vahşi tip ve *Casq2*^{-/-} farelerin EKG dataları karşılaştırılırken QRS komplekslerinin profillerinde morfolojik farklılıklar tespit edildi (Şekil 6.3). Vahşi tip sağlıklı farelerde QRS komplekslerinin R dalgası tek tepeden oluşuyorken (Şekil 6.3 A), *Casq2*^{-/-} farelerin R dalgası ikiye ayrılan tepeler görüldü (Şekil 6.3 B). Bu morfolojiyi sergileyen QRS dalgaları, literatürde M şekilli QRS kompleksi (M-shaped QRS complex) olarak yer almakta ve kalpte sağ ve sol his demetlerine ayrılan elektriksel ileti sistemindeki blokları temsil etmektedir (202). Literatürde ventriküler taşikardi hastalarında ileri aşamalarda his demeti blokları görülebilmektedir ve bu profil EKG verilerine yansiyabilmektedir (203). Sonuç olarak, bu tez çalışmasında kullandığımız *Casq2*^{-/-} farelerin ventriküler taşikardi hastalık modeli olarak kullanılabileceği EKG verileriyle doğrulanmıştır.



Şekil 6.3 Vahşi tip ve transgenik farelerin EKG verilerinin karşılaştırılması. (A) Vahşi tip ve (B) *Casq2*^{-/-} farelerden alınan EKG verilerinde dalgalar ve intervallerin tanımlandığı grafikler. EKG: Elektrokardiyografi, mV: milivolt. Sn: saniye. V: Voltaj. N=10.

Biopac Student Lab programıyla belirlenen EKG parametrelerinin analizinde, TP intervali izoelektrik çizgisini göstermektedir ve EKG analizlerine izoelektrik çizgisi net bir şekilde gözlenen atımlar dahil edilmiştir. RR aralığı ardarda gelen iki R dalgası arasındaki zamanın ölçülmesi ile belirlendi. Aynı zamanda RR aralığı ile kalbin dakikadaki atım sayısı (BPM= beats per minute) hesaplanmaktadır. QRS genişliği, QRS kompleksinin maksimum ve minimum voltaj çıkışları arasındaki farkının ölçülmesiyle belirlendi. QT aralığı, QRS kompleksinin başlangıcından T dalgasının bitimine kadar olan süre olarak kaydedildi. Doğrulanmış QT aralığı (QTc), anestezi altındaki fare ve sıçanlarda invaze olmayan EKG ölçümü için optimize edilen $QTc = QT + 0,00175 \times (BPM - 60)$ şeklindeki Hodges formülü ile hesaplandı (204). Vahşi tip ve *Casq2*^{-/-} farelerin EKG şemalarında belirlenen dalga ve intervallerini kantitatif açıdan değerlendirmek amacıyla, EKG parametrelerin milisaniye (ms) cinsinden hesaplandı ve GraphPad programı ile istatistiksel analizi yapıldı (Tablo 6.1).

Tablo 6.1 Vahşi tip ve *Casq2*^{-/-} farelerine ait EKG parametreleri. ms: milisaniye. dk: dakika. N= Deney sayısı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiştir. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

EKG Parametreleri	Vahşi tip (N = 10)	<i>Casq2</i> ^{-/-} (N = 10)	P
BPM (Atım/dk)	192,24 $\pm$ 19,55	287,66 $\pm$ 73,79	***<0,0001
PR intervali (ms)	0,036 $\pm$ 0,005	0,035 $\pm$ 0,003	0,824
QRS kompleksi (ms)	0,049 $\pm$ 0,011	0,046 $\pm$ 0,011	* 0,0465
ST intervali (ms)	0,140 $\pm$ 0,071	0,055 $\pm$ 0,033	***<0,0001
TP intervali (ms)	0,017 $\pm$ 0,008	0,012 $\pm$ 0,005	***<0,0001
RR intervali (ms)	0,312 $\pm$ 0,031	0,221 $\pm$ 0,050	***<0,0001
QT intervali (ms)	0,194 $\pm$ 0,082	0,101 $\pm$ 0,030	***<0,0001
QTc intervali	0,428 $\pm$ 0,054	0,499 $\pm$ 0,116	*** 0,0005

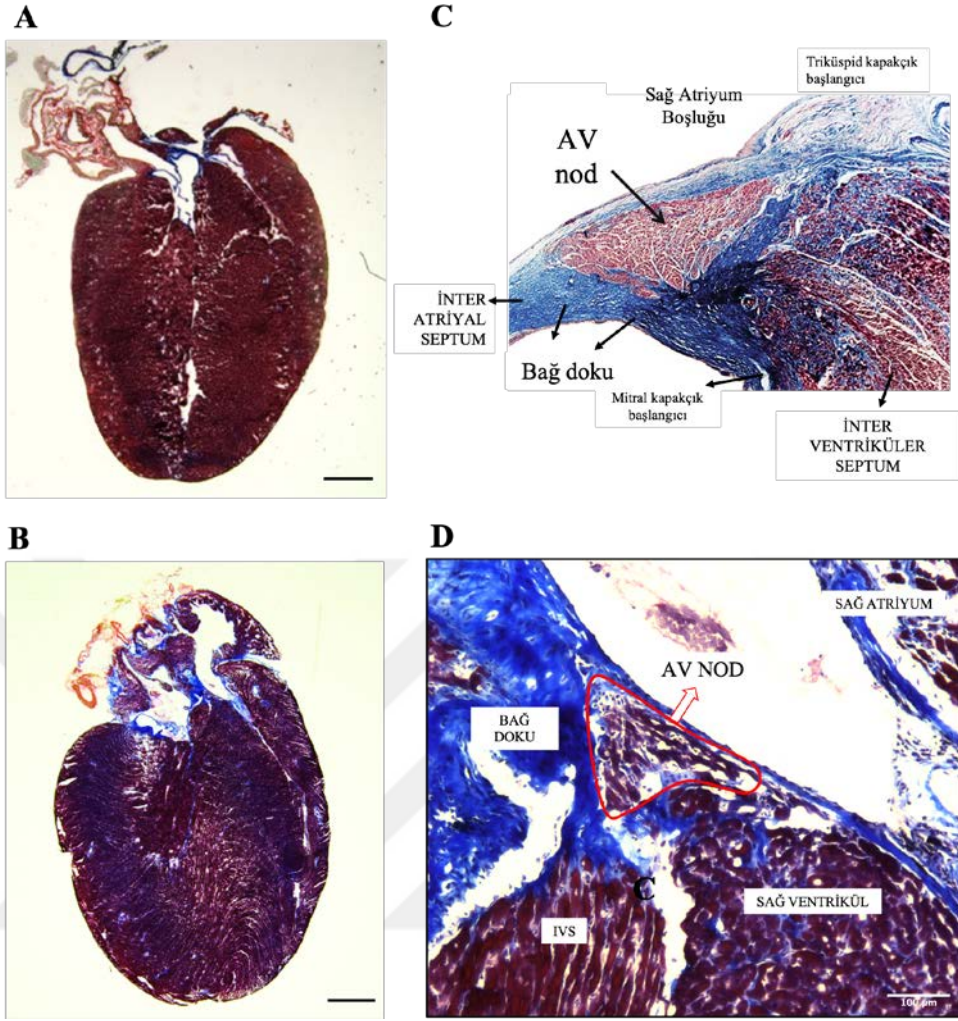
EKG ölçümlerinde öncelikle fare grupları arasındaki BPM sayıları karşılaştırıldı. RR interval süresinin kısılması ile ters orantılı olarak arttığı gözlenen BPM sayıları, vahşi tip farelerde 192,24 $\pm$ 19,55 BPM olarak hesaplanırken *Casq2*^{-/-} farelerde 287,66 $\pm$ 73,79 BPM olarak tespit edildi ($P < 0,0001$, Tablo 6.1). CPVT hastalık modeli sergileyen farelerin BPM sayılarının vahşi tip sağlıklı farelere oranla

istatistiksel açıdan anlamlı olarak artışı, *Casq2*^{-/-} farelerin taşikardik kalp atım fenotipini doğruladı. Atriyoventriküler noddan elektriksel ileti geçişini simgeleyen PR interval süresi açısından iki grup arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($P=0,824$). EKG ölçümlerinde belirlenen QRS kompleksi, ST, TP ve QT interval süreleri incelendiğinde, *Casq2*^{-/-} farelerde bu parametrelerin vahşi tip farelere oranla anlamlı olarak azaldığı hesaplandı ($P<0,0001$, Tablo 6.1). *Casq2*^{-/-} farelerde belirlenen QRS kompleksi, ST, TP ve QT intervalleri sürelerindeki azalma, bu farelerde birim zamanda gerçekleşen hızlı kasılma-gevşeme periyotlarına bağlı olarak gerçekleşmiştir. Önemli olarak, *Casq2*^{-/-} farelerde vahşi tip farelere kıyasla istatistiksel anlamlı olarak uzayan QTc intervali, Uzun QT sendromunun temel belirteci olmakla birlikte literatürde CPVT hastalarında da tespit edilmiştir (189, 205).

Tüm EKG parametrelerinin değerlendirilmesi ile *Casq2*^{-/-} farelerin taşikardi hastalık modeli sergilediği teyit edildikten sonra, bu farelerde atriyoventriküler (AV) nod bölgesinin anatomik olarak tespiti gerçekleştirildi.

6.1.3 Fare kalp dokularında Mason Trikrom boyamalar

Fare kalplerinde AV nodun lokasyonunun belirlenebilmesi için öncelikle Hematoksilen & Eozin histokimyasal boyaması yapıldı. Fakat bu tekniğin iki boya içermesi ve sadece sitoplazma ve çekirdeği boyamasının yeterli seçiciliğe sahip olmaması nedeniyle, AV nod bölgesi civar dokulardan ayırıcı olarak ayırt edilemedi. Bu nedenle daha detaylı ve doku içi hücre çeşitlerini analiz etmeye yarayan immünohistokimyasal boyama çeşidi Mason Trikrom tekniğinden faydalanıldı.



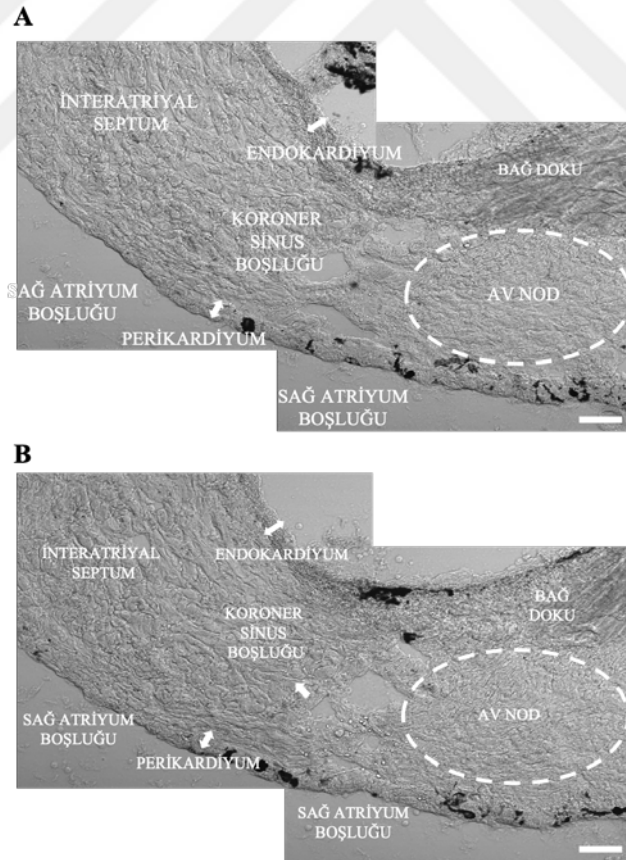
Şekil 6.4 Fare kalp kesitlerinde mason trikrom boyamalar. Mason trikrom boyama tekniği sonrası (A) Vahşi tip ve (B) *Casq2*^{-/-} fare kalp kesitlerinin 11.2X büyütmede Axio mikroskopi görüntüsü. Ölçek çubuğu: 1 mm. N=2. (C) Mason trikrom boyanmış fare kalp dokusunda AV nodun yerini gösteren temsili şekil (Thoracic key fare atlasından uyarlanmıştır). (D) AV nodun anatomik lokasyonunun tespit edildiği alanın Axio mikroskopi görüntüsü. AV: Atriyoventriküler.

Sağlıklı (Şekil 6.4 A) ve *Casq2*^{-/-} farelerin kalplerinde (Şekil 6.4 B) Mason Trikrom boyamamız sonucu tüm kalp dokusuna baktığımızda kas dokusundan oluşan kısımların protokole uygun şekilde bordo renkli, bağ dokuların ise mavi renkli boyandığı gözlemlendi. Daha ileri magnifikasyonlara geçip AV nodun lokasyonunu tayini etme çalışmalarımızda, literatürde yer alan fare doku atlasından faydalandı (Şekil 6.4 C) (206). Bu temsili görüntünün de yardımıyla AV nod bölgesinin, sağ ve sol atriyum arası ince doku interatriyal septumun, sağ atriyuma bakan kısmında ve triküspid kapağın başlangıç bölgesinde lokalize olduğu tespit edildi (Şekil 6.4 D). Bu boyama

teknikği ile aynı zamanda AV nodun etrafının mavi renkle boyanan kolajen lifleri içeren bağ doku ile çevrili olduğu literatür ile uyumlu olarak gözlemlendi (Şekil 6.4 D) (189).

6.1.4 Atriyoventriküler nodun lokasyonunun aydınlık alan mikroskobu ile incelenmesi

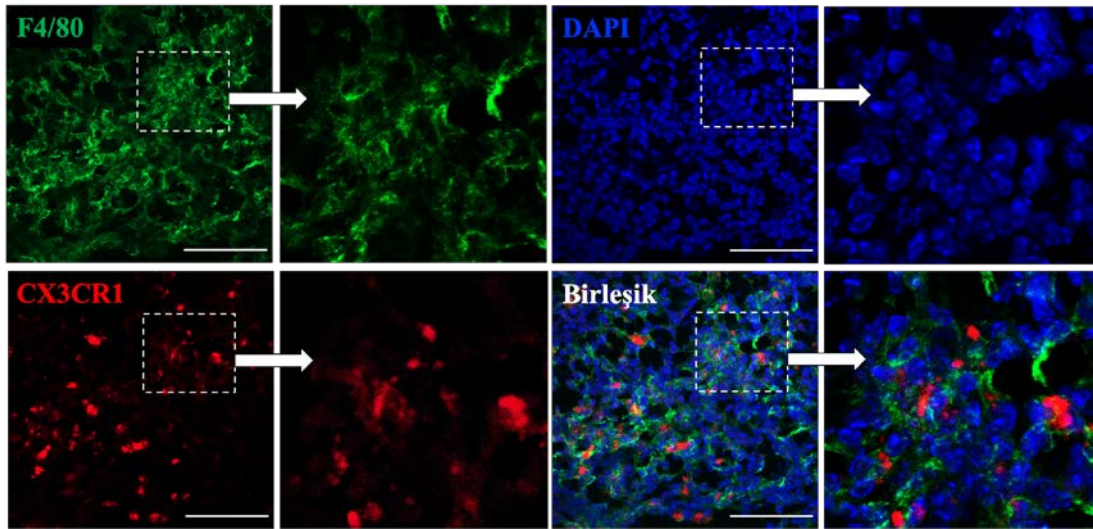
Bu tez çalışmasında, vahşi tip ve *Casq2*^{-/-} farelerin kalp dokularında AV nodu tespit edip buradaki kardiyak makrofajları kalitatif ve kantitatif olarak incelemeyi amaçladık. Mason trikrom boyama metoduyla AV nod lokasyonu tespit edilmiş olsa da, alınan tüm kesitlerden AV nod spesifik immünohistokimyasal boyamaların yapılmasının zaman ve bütçe açısından zorluk oluşturacağı öngörüldü. Bu nedenle, vahşi tip (Şekil 6.5 B) ve *Casq2*^{-/-} (Şekil 6.5 C) fare kalp dokularından alınan kesitlerde öncelikle AV nodu içeren kalp kesitleri, aydınlık alan (bright field) ışık mikroskobu ile tespit edildi. Bu kesitler kayıt altına alınarak immünboyamalarda kullanıldı.



Şekil 6.5 Fare kalp kesitlerinde AV nodun ışık mikroskobu ile belirlenmesi. (A) Vahşi tip ve (B) *Casq2*^{-/-} fare kalp kesitlerinde AV nodu içeren bölgelerin ışık mikroskobu görüntüsü. N=4. Ölçek çubuğu: 50 μ m.

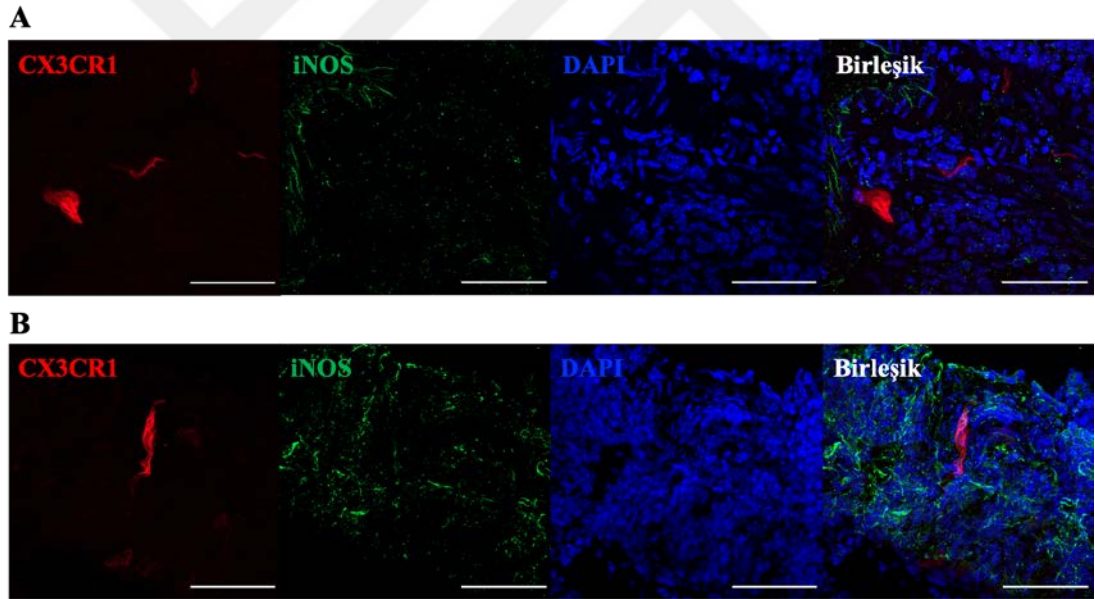
6.1.5 Fare dalak dokusu immü floresan boyamaları

Fare kalp doku kesitlerinde AV nod ve kardiyak makrofajların immü floresan boyamalarından önce, antikorların dilüsyon ve muamele sürelerinin optimizasyon deneyleri, immü sistem hücrelerince zengin olan dalak dokularında gerçekleştirildi. Vahşi tip farelerin dalak dokularının immü floresan boyamalarında, makrofajların işaretlenmesi için anti-CX3CR1-647 ve anti-F4/80-488 konjuge antikorlar kullanıldı. Her iki antikorun makrofaj hücrelerini işaretlediği gözlene de, dalak kesitlerinde literatür ile uyumlu olarak yoğunlukla F4/80⁺ makrofajlar tespit edildi (207). Dalak dokusunda CX3CR1⁺ makrofajlar, F4/80⁺ makrofajlardan daha az yoğunlukta tespit edildi (Şekil 6.6). Literatürde fetal gelişim kökenli dokuya yerleşik makrofajların yüksek CX3CR1 ifadeli fenotipe sahip olduğu, monosit kökenli makrofajların dokuya geçip olgunlaştıkları zaman F4/80⁺ fenotip sergilediği ve düşük / orta seviyede CX3CR1 ifade ettiği bilinmektedir (154). Bu sebeple fare dalak kesitleri immü boyamaları sonucu CX3CR1⁺ doku makrofajlarını, monosit kökenli F4/80⁺ makrofajlardan daha yoğun olarak gözlemlememiz literatür ile uyumlu bir bulgudur. Önemli olarak, bu iki makrofaj popülasyonu arasında örtüşme gözlenmemesi bize dalakta farklı alt tiplerde makrofaj popülasyonları olabileceğini gösterdi (Şekil 6.6).



Şekil 6.6 Vahşi tip fare dalak kesitlerinde makrofajların immü boyaması. CX3CR1⁺ ve F4/80⁺ makrofaj popülasyonunun floresan mikroskop görüntüsü. DAPI: Çekirdek boyası. Ölçek çubuğu: 50 µm. Şekillerdeki kesikli çizgi ile odaklanılmış bölgeler 10X büyütülmüştür.

Bu tez çalışmasındaki fare kalp dokularında AV nod kardiyak makrofajlarının inceleme amacımızın yanı sıra kardiyak makrofajların özellikle hastalık durumunda pro-inflamatuvar M1 fenotipi açısından araştırmayı da hedefledik. Bu nedenle öncelikle, vahşi tip (Şekil 6.7 A) ve *Casq2*^{-/-} farelerin (Şekil 6.7 B) dalak kesitlerinde M1 fenotipi belirteci iNOS (indüklenebilir nitrik oksit sentaz) enzimini işaretleyen anti-iNOS antikoru ile immünboyamalar gerçekleştirdik. Boyama sonucu, *Casq2*^{-/-} farelerin dalak dokularında iNOS⁺ hücreler sağlıklı farelere göre daha yoğun bir şekilde tespit edilirken, CX3CR1⁺ makrofajlar ile iNOS⁺ hücreler arasında örtüşme gözlenmedi (Şekil 6.6). Bu sonuç bize dalakta bulunan CX3CR1⁺ dokuya yerleşik makrofajlar dışında iNOS enzimini üreten diğer hücre tiplerinin varlığını göstermiştir. Bununla birlikte, gelecekte deney sayısının çoğaltılmasıyla ve antikor seçiciliği göz önünde bulundurulursa CX3CR1⁺ makrofajlarda iNOS protein ifadeleri araştırılabilir.



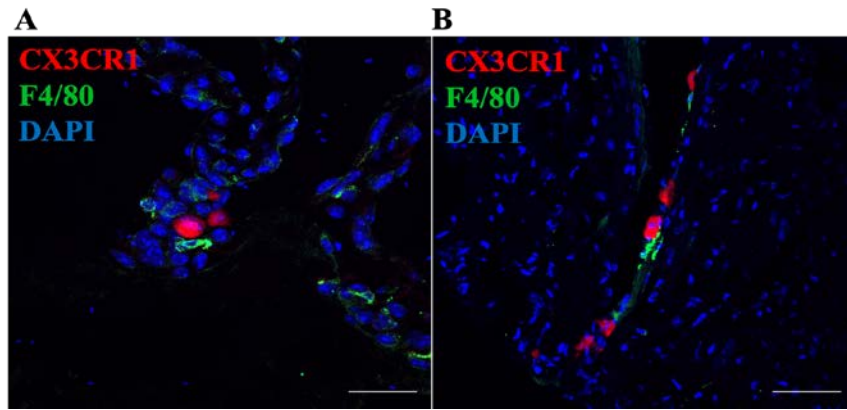
Şekil 6.7 Fare dalak kesitlerinde M1 makrofaj fenotipi immünboyaması. (A) Vahşi tip ve (B) *Casq2*^{-/-} fare kalp kesitlerinin M1 tip iNOS⁺ makrofaj popülasyonunun floresan mikroskop görüntüleri. N=1. DAPI: Çekirdek boyası. iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz. Ölçek çubuğu: 50 µm.

6.1.6 Fare kalp dokusunda immünfloresans boyamalar

Fare kalp kesitlerinde makrofaj odaklı immünboyamaların ilk aşamalarında, F4/80-488 konjuge antikoru kullanıldı, fakat miyokardiyum kas yoğunluklu

dokusunun otofloresan özellik göstermesi sebebiyle tüm miyokardiyum dokusunda, 488 nm dalga boyunda yanlış pozitifliğe yol açan bir reaktivite tespit edildi. Bu nedenle F4/80-488 konjuge antikorunun bağlandığı spesifik boyanma, otofloresan dokudan ayırt edilemedi. Ayrıca, dalak dokusunda da dokuya yerleşik makrofajların CX3CR1 proteininden daha yoğun bir şekilde F4/80 ifade etmesinin teyit edilmesiyle de bu aşamadan sonra kalp dokusu immünboyama çalışmalarına CX3CR-647 konjuge antikor ile devam edildi.

F4/80-488 ve CX3CR1-647 konjuge antikorlarını birlikte kullandığımız immünboyama incelemelerimizde, kalbin AV nodunu içerecek şekilde tüm sağ atriyumun kesitlerinin alındığı örneklerin taranması sonucunda, kalbin tüm odacıklar ve kulakçıklarında CX3CR1⁺ makrofajlar yer yer tespit edildi. CX3CR1⁺ makrofajların AV nod içerisinde ve diğer kalp bölgelerinde pozitif gözlenmesiyle birlikte, F4/80⁺ makrofajlar kalp kapakçıkları ve endokardiyum tabakaları dışında tespit edilemedi. Ayrıca, F4/80⁺ ve CX3CR1⁺ makrofajlar birlikte yer aldıkları kapakçıklarda (Şekil 6.8 A) ve endokardiyumda (Şekil 6.8 B), dalak dokusuna benzer bir sonuç göstererek ayrı hücre popülasyonları şeklinde işaretlendi. İlginç olarak, F4/80⁺ ve CX3CR1⁺ makrofajlar genellikle birbirlerine yakın şekilde lokalize oldukları gözlemlendi (Şekil 6.8).



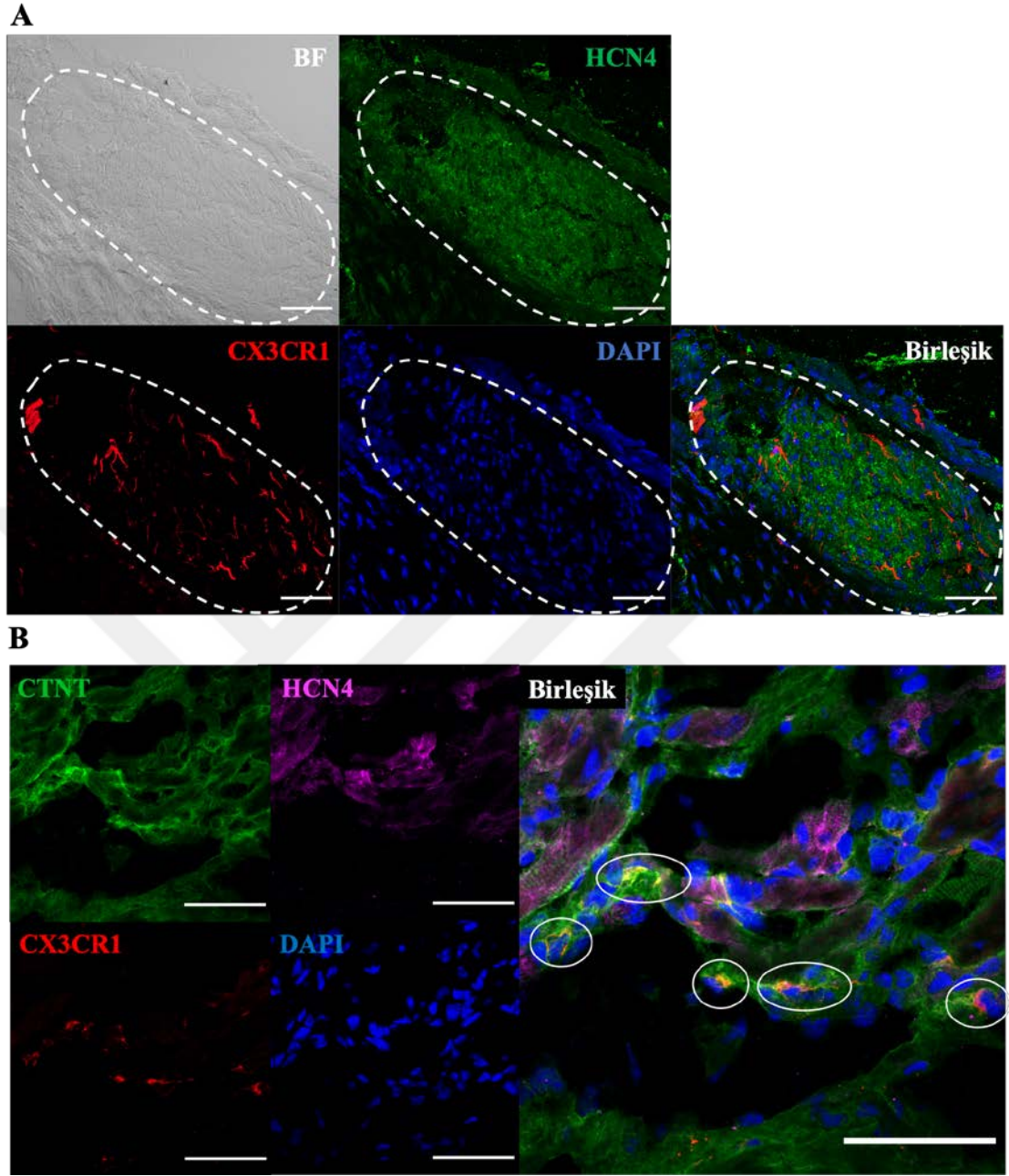
Şekil 6.8 Fare kalplerinde birlikte lokalize olan CX3CR1⁺ ve F4/80⁺ makrofajların immünboyama analizi. (A) Sol ventrikülden köken alan mitral kapakçıkta ve (B) sağ atriyum endokardiyum tabakasında bulunan CX3CR1⁺ ve F4/80⁺ makrofajların immünboyama görüntüleri. N=1. DAPI: Çekirdek boyası. Ölçek çubuğu: 50 µm.

F4/80⁺ makrofajların CX3CR1⁺ makrofajlara yakın olarak lokalize olmaları, CX3CR1⁺ makrofajların düzenlediği kemokin sinyal mekanizması doğrultusunda gerçekleşmiş olabilir. Bununla birlikte, gelecekte F4/80⁺ makrofajlar ile CX3CR1⁺ makrofajların kalpteki yerleşimleri, deney sayısının artırılmasıyla daha ayrıntılı incelenebilir.

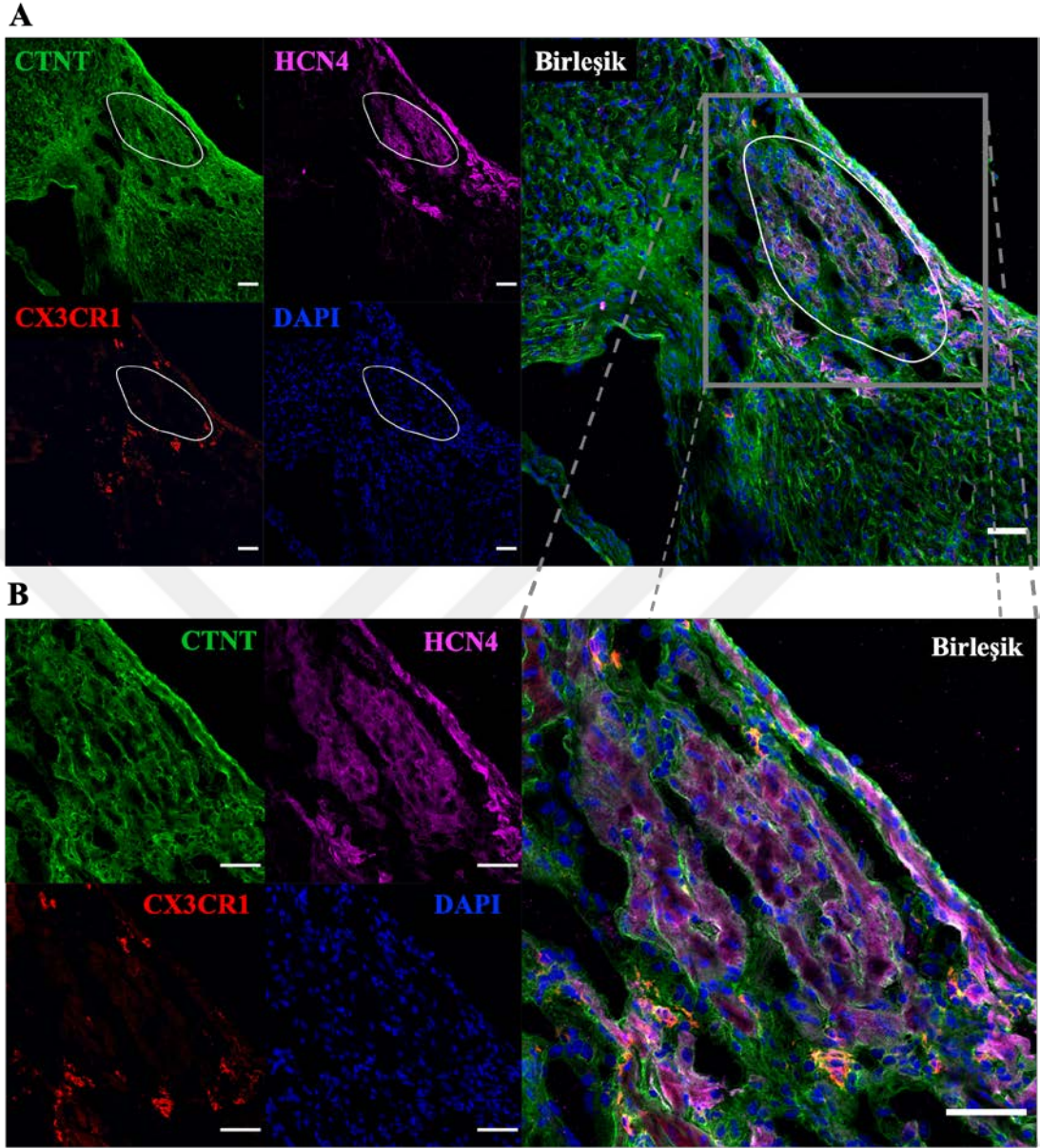
6.1.7 Fare kalp dokusunda AV nodun immünfloresans boyamaları

Fare kalp kesitlerinde ışık mikroskopi ayarlarında tespit edilen AV nod bölgesini içeren kesitlerin immün boyamalarında, AV nod kardiyomiyositleri için anti-HCN4 antikoru (208), genel kardiyomiyosit belirteci kardiyak troponin proteini için anti-CTNT antikoru ve makrofaj hücreleri için anti-CX3CR1-647 antikorları kullanıldı. Vahşi tip farelerde CX3CR1⁺ makrofajların, HCN4⁺ kardiyomiyositlerin oluşturduğu AV nod bölgesi içerisinde yer aldığı gözlemlendi (Şekil 6.9 A). Makrofajların tespit edildiği AV nod bölgelerinde ileri magnifikasyonlarda detaylı incelenme yapıldığında, CX3CR1⁺ makrofajların homojen bir dağılımla HCN4⁺ ve CTNT⁺ kardiyomiyosit hücreleri aralarında yer aldığı net bir şekilde gösterildi (Şekil 6.9 B).

Sağlıklı farelerdeki AV nod immünboyamasını takiben *Casq2*^{-/-} farelerin AV nod bölgelerinin immünboyamaları ile kardiyak makrofajların lokasyon ve yoğunlukları incelendi. Sağlıklı farelerin AV nod bölgelerinin içerisinde yüksek oranda CX3CR1⁺ makrofajları gözlenirken (Şekil 6.9), *Casq2*^{-/-} farelerin AV nod bölgelerinde CX3CR1⁺ makrofajlar vahşi tipe oranla daha az yoğunlukta tespit edildi (Şekil 6.10). Bu yoğunluk farkını gösteren kantitatif analiz, CX3CR1⁺ makrofajları içeren AV nod çevresi dokuyu kapsayacak şekilde gerçekleştirildi.



Şekil 6.9 Vahşi tip fare AV nod bölgesinde bulunan CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların immünboyaması. AV nod spesifik HCN4⁺ kardiyomiyositler, CTNT⁺ kardiyomiyositler ve CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların (A) 20X ve (B) 40X magnifikasyonda kaydedilmiş floresan mikroskop görüntüleri. N=4. DAPI: Çekirdek boyası. CTNT: Kardiyak troponin-T. HCN4: Hiperpolarizasyon aktive siklik nükleotid kapılı potasyum kanalı 4. Ölçek çubuğu: 50 μm.

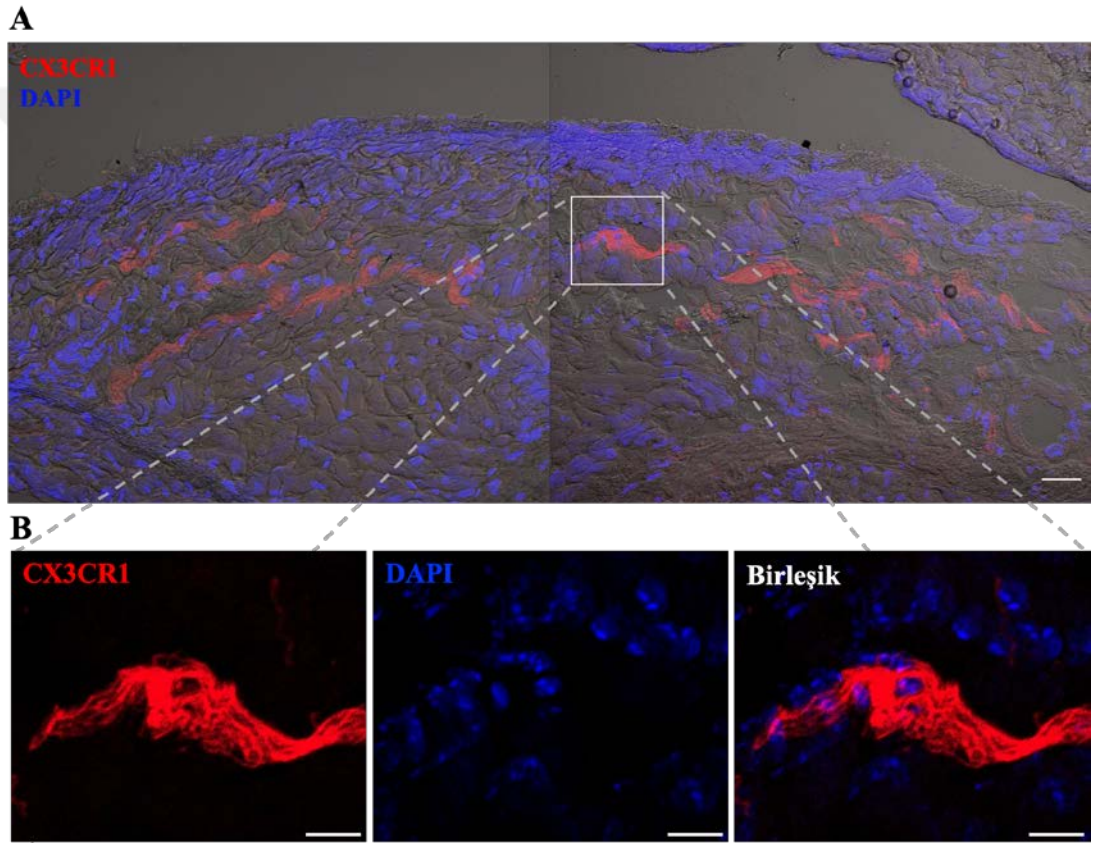


Şekil 6.10 *Casq2*^{-/-} fare kalp kesitlerinde AV nod bölgesi CX3CR1⁺ makrofajların immün boyaması. (A) HCN4⁺ AV nod spesifik kardiyomiyositler, CTNT⁺ kardiyomiyositler ve CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların floresan mikroskop görüntüsü. (B) Şekil 3,5X büyütülmüştür. N=4. DAPI: Çekirdek boyası. CTNT: Kardiyak troponin-T. HCN4: Ölçek çubuğu: 50 µm.

Bununla birlikte HCN4⁺ kardiyomiyositlerin tamamı CTNT⁺ gözlenirken, tüm CTNT⁺ miyokardiyum kardiyomiyositlerinin HCN4⁺ olmaması bu antikorun spesifik boyama sergilediğini ve AV nodda farklı kardiyomiyosit popülasyonlarının olduğunu göstermiştir.

6.1.8 CX3CR1⁺ makrofajların morfolojik olarak incelenmesi

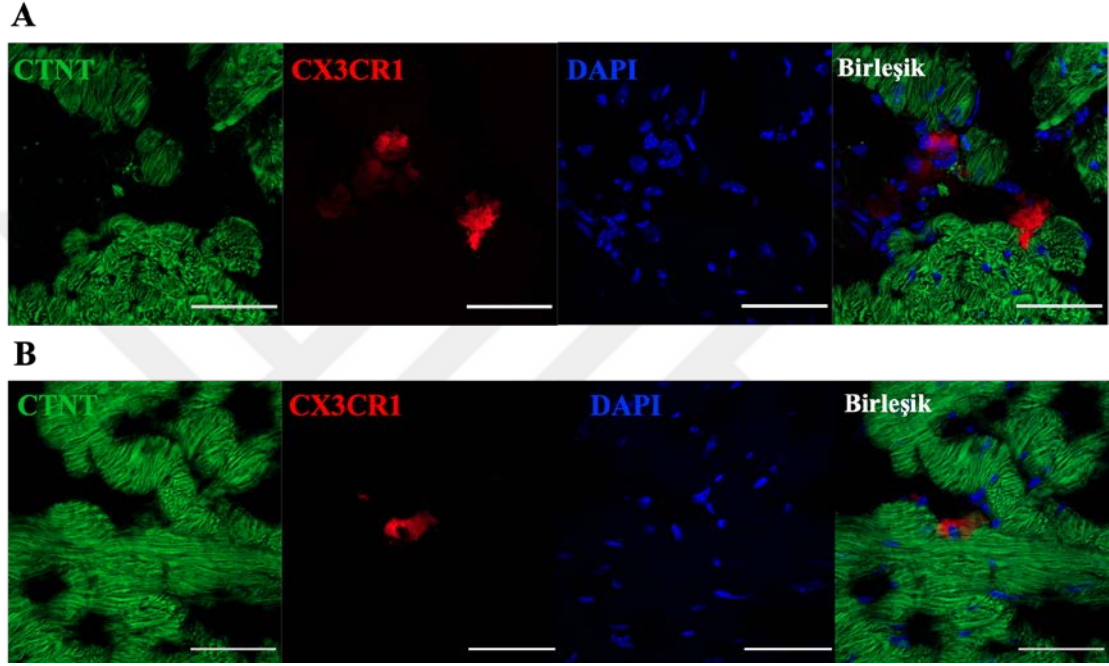
Kalbin tamamında CX3CR1⁺ hücreler detaylı incelendiğinde sağlıklı fare kalbinde AV nod içerisindeki makrofajların morfolojileri hücre sınırları ayırt edilemeyecek şekilde, kümesel ve uzantısal hat şeklinde (spindle) olduğu gözlemlendi (Şekil 6.11). Bu morfoloji sağlıklı fare kalbinde ilk defa AV nod bölgesinde keşfedilmiş kardiyak makrofajların literatürdeki morfolojik analizi ile uyum göstermektedir (9).



Şekil 6.11 Sağlıklı fare kalbinde AV nod içi CX3CR1⁺ makrofaj morfolojisinin immünboyamalarla incelenmesi. (A) Tüm AV nodu gösteren floresan mikroskop görüntüsü. Ölçek çubuğu: 50 µm. (B) Kümesel yerleşimli AV nod içi CX3CR1⁺ makrofajların floresan mikroskop görüntüsü. N=4. Ölçek çubuğu: 10 µm. DAPI: Çekirdek boyası.

Casq2^{-/-} farelerin AV nod içinde CX3CR1⁺ makrofajlar gözlenmemesinin ardından (Şekil 6.10), sağlıklı (Şekil 6.12 A) ve *Casq2*^{-/-} farelerin (Şekil 6.12 B) AV nod harici diğer bölgeleri CX3CR1⁺ hücrelerin yerleşimi açısından incelendi. AV nod

harici kalbin diğer bölgelerinde CX3CR1⁺ makrofajların tekli hücreler halinde yerleştiği ve yuvarlak formda morfoloji sergilediği gözlemlendi (Şekil 6.12). Bununla birlikte bu incelemelerde tekli halde bulunan CX3CR1⁺ makrofajların CTNT⁺ kardiyomiyosit hücreleri aralarında membran temasına benzer konumlandıkları tespit edildi (Şekil 6.12).

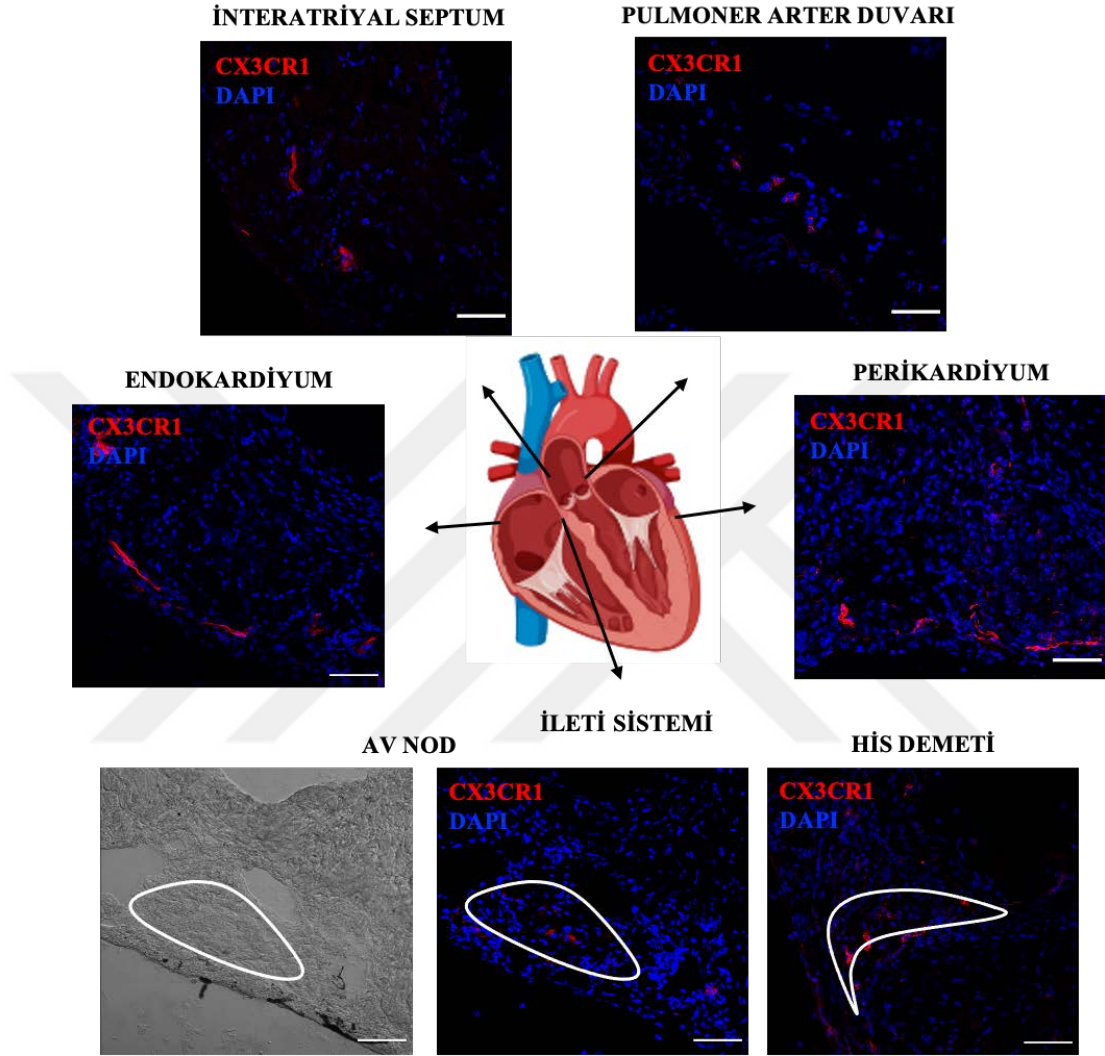


Şekil 6.12 AV nod dışı miyokardiyum doku içerisinde CX3CR1⁺ makrofaj morfolojisinin immünboyamalarla incelenmesi. (A) Vahşi tip ve (B) *Casq2*^{-/-} fare kalp kesitlerinde yuvarlak şekilli makrofajların floresan mikroskop görüntüleri. N=4. CTNT: Kardiyak troponin-T. DAPI: Çekirdek boyası. Ölçek çubuğu: 50 µm.

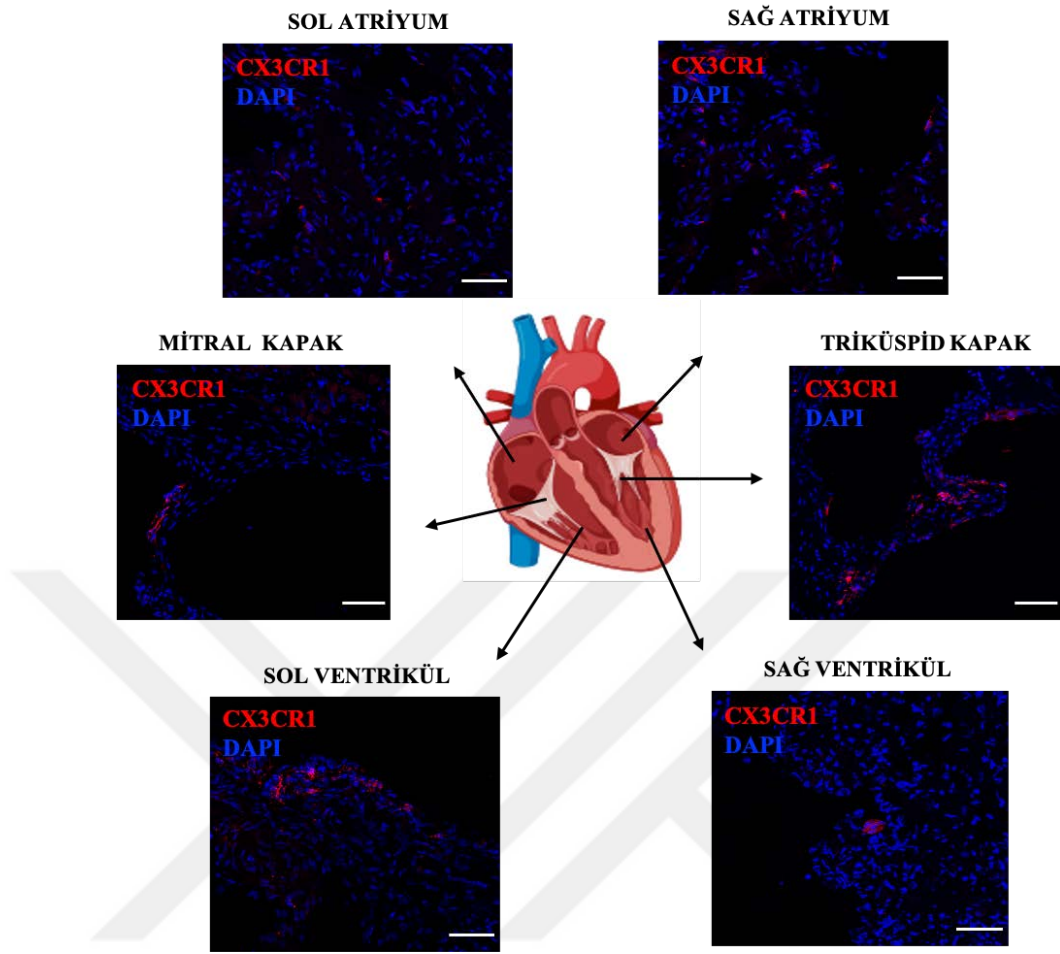
6.1.9 AV nod dışı bölgelerde kardiyak makrofajların incelenmesi

Kalbin genelinde CX3CR1⁺ makrofajların lokasyon ve morfolojilerini gözlemlemek amaçlı genel bir doku taraması yapıldı ve kalbin tüm lokasyonlarında fakat farklı yoğunluklarda CX3CR1⁺ makrofajlara rastlandı. Vahşi tip fare kesitlerinde interatriyal septum ve pulmoner arter damar duvarı gibi AV nod civarı bölgelerde ve endokardiyum, perikardiyum gibi kalbin en iç ve dış tabakalarında CX3CR1⁺ makrofajlara rastlandı (Şekil 6.13). AV nod dışı bölgeler olarak, AV nodun her iki yanında yer alan triküspid ve mitral kapakçıklar, sağ / sol atriyum ve ventrikül miyokardiyum dokularında da CX3CR1⁺ makrofaj popülasyonları yer yer gözlemlendi.

(Şekil 6.14). Vahşi tip sağlıklı fare kalp dokularında, en fazla makrofaj içeren lokasyon, literatür ile uyumlu olarak AV nod bölgesi olarak tespit edildi (9).

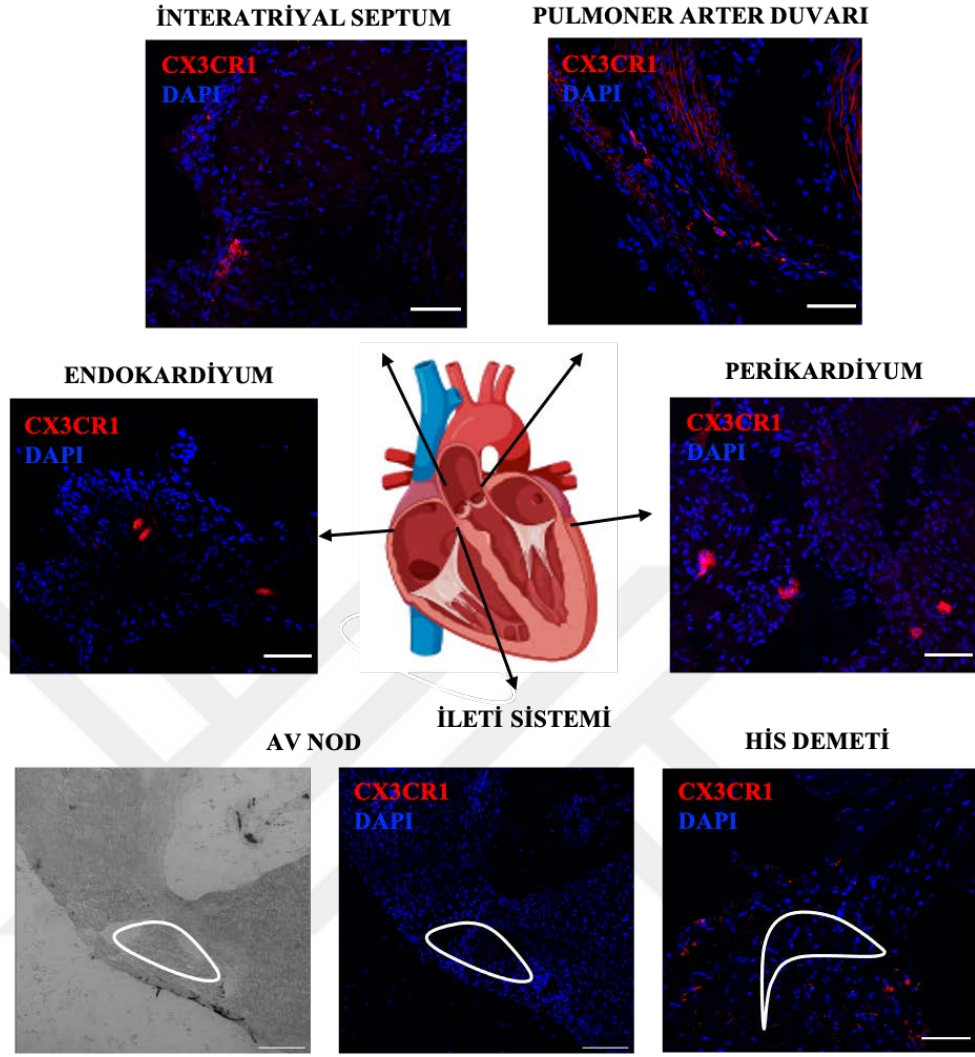


Şekil 6.13 Vahşi tip fare kalbinin ileti sistemi ve kalp tabakalarında CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların immünboyaması. N=4. BF: Bright field. DAPI: Çekirdek boyası. Ölçek çubuğu: 50 µm.



Şekil 6.14 Vahşi tip fare kalbinin odacık ve kapakçıklarında CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların immünboyaması. N=4. BF: Bright field. DAPI: Çekirdek boyası. Ölçek çubuğu: 50 µm.

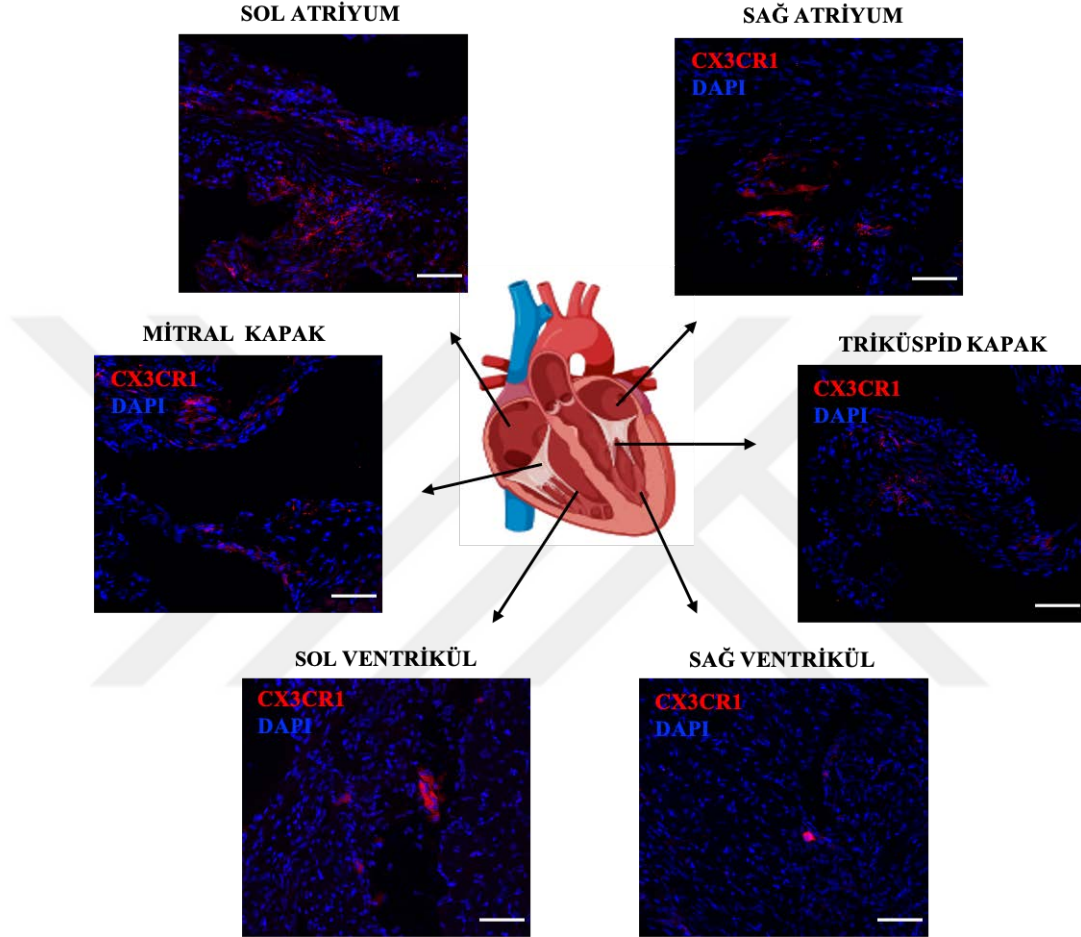
Casq2^{-/-} farelerin kalp dokularında CX3CR1⁺ makrofajlar, AV nod içerisinde ve devamındaki his demeti yolunda vahşi tip farelerdeki kadar yoğun gözlenmedi. Fakat AV nodu içeren interatriyal septum bölgesi ve sağ atriyumda CX3CR1⁺ makrofajlar tespit edildi. Özetle, *Casq2*^{-/-} farelerin kalp dokularında CX3CR1⁺ makrofajların olduğu bölgeler, vahşi tip ile aynı bölgelerdi (Şekil 6.15, Şekil 6.16).



Şekil 6.15 *Casq2*^{-/-} fare kalbinin ileti sistemi ve kalp tabakalarında CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların immünboyaması. N=4. BF: Bright field. DAPI: Çekirdek boyası. Ölçek çubuğu: 50 µm.

CX3CR1⁺ makrofajların yoğunluğu açısından gözlemimiz, sağ ve sol atriyumda ventrikül içi dokulardan daha fazla kardiyak makrofajların olduğuydu. Genel olarak ise, perikardiyum ve endokardiyumda miyokardiyum tabakasından daha fazla CX3CR1⁺ makrofajların lokalize olduğu gözlemlendi. Kalbin geneline yayılmış olan kardiyak makrofajların lokasyonları literatür bulguları ile uyumlu olarak gözlemlendi (112).

Vahşi tip ve *Casq2*^{-/-} fareler arasındaki kardiyak makrofajların M1/M2 fenotipleri açısından farkını incelemek için anti-iNOS antikoru ile immün boyamaları yapıldı, fakat CX3CR1⁺ makrofajlar ile örtüşen iNOS⁺ hücre tespit edilemedi.

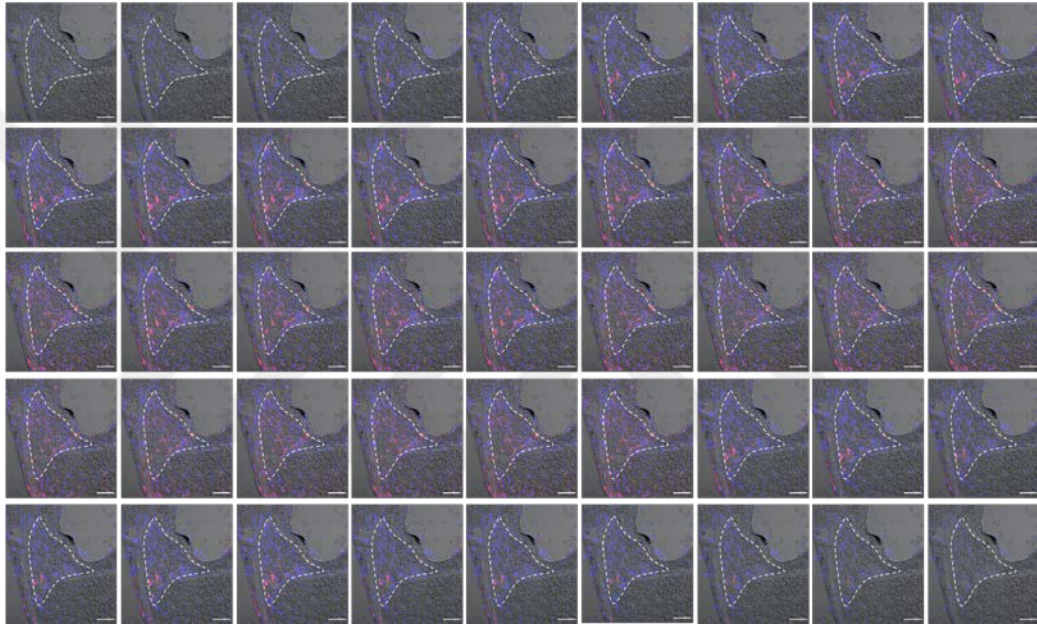


Şekil 6.16 *Casq2*^{-/-} fare kalbinin odacık ve kapakçıklarında CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların immünboyaması. N=4. BF: Bright field. DAPI: Çekirdek boyası. Ölçek çubuğu: 50 µm.

6.1.10 Fare kalp dokularında CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların yoğunluk analizi

Fare kalp dokularındaki CX3CR1⁺ makrofajların kalbin çeşitli bölgelerinde yer aldığı daha önceki immünboyama analizlerinde gösterilmişti. *Casq2*^{-/-} farelerin kalp dokularında CX3CR1⁺ makrofajların AV nod harici interatriyal septumun diğer bölgelerinde gözlenmesi üzerine, makrofaj yoğunluk analizleri AV nodu içerisine alan

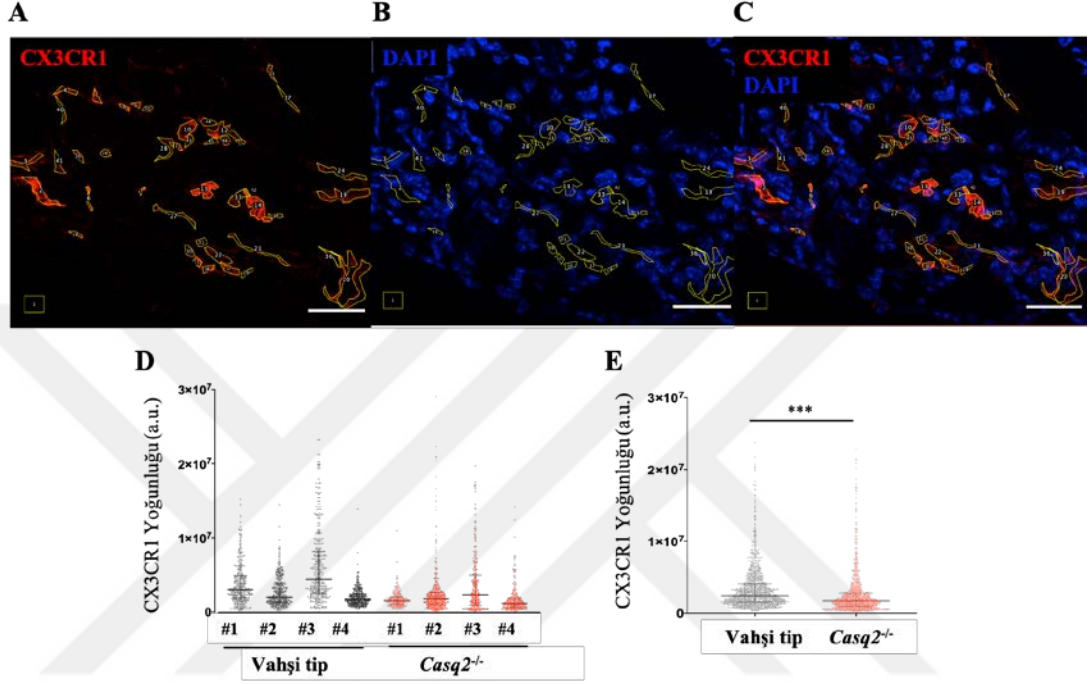
tüm sağ atriyum dokusunu kapsayacak şekilde gerçekleştirildi. Buradan yola çıkarak, CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların yoğunluklarının hastalık patogenezinde bir ilişkisi olup olmadığını anlamak amacıyla, sağlıklı grup ve CPVT hastalık modeli sergileyen *Casq2*^{-/-} farelerdeki CX3CR1⁺ makrofajların kantitatif sinyal ölçümleri hesaplandı. Konfokal mikroskobun Z-stack eklentisi ile kaydedilmiş görüntülerde CX3CR1⁺ makrofajların gözlenmeye başladığı ve sonlandığı, AV nodu içeren tüm interatriyal septum bölgeleri analize alındı (Şekil 6.17).



Şekil 6.17 CX3CR1⁺ makrofajların gözlenmeye başladığı ve sonlandığı AV nodu içeren interatriyal septum bölgelerini içeren kesitler. N=4. BF: Bright field. DAPI: Çekirdek boyası. Ölçek çubuğu: 50 µm.

Bu bölgelere yüksek magnifikasyonlarda odaklanarak öncelikle taban değeri (B: Background) oluşturması için makrofaj (Şekil 6.18 A) veya çekirdek (Şekil 6.18 B) içermeyen bir alan seçildi. Makrofaj ve çekirdek işaretlenmesinin 647 nm ve 405 nm dalga boylarının ortak ışına verdiği alanlardaki makrofajların hücre kenarları ImageJ programında seçilerek bir değer elde edildi (Şekil 6.18 C). Bu değerler yalancı pozitifliğe sebep olmaması açısından taban değerinden çıkartılarak tüm alanlardaki CX3CR1⁺ makrofaj yoğunluklarının kantitatif değerleri hesaplandı. Bu değerlerin grafiği dört sağlıklı ve dört *Casq2*^{-/-} farelerde ayrı ayrı (Şekil 6.18 D) ve total şekilde

gösterildi (Şekil 6.18 E). İstatistiksel analiz sonucu, *Casq2*^{-/-} farelerde CX3CR1⁺ makrofaj yoğunluğunun vahşi tip sağlıklı farelere oranla anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi ($P<0,0001$).



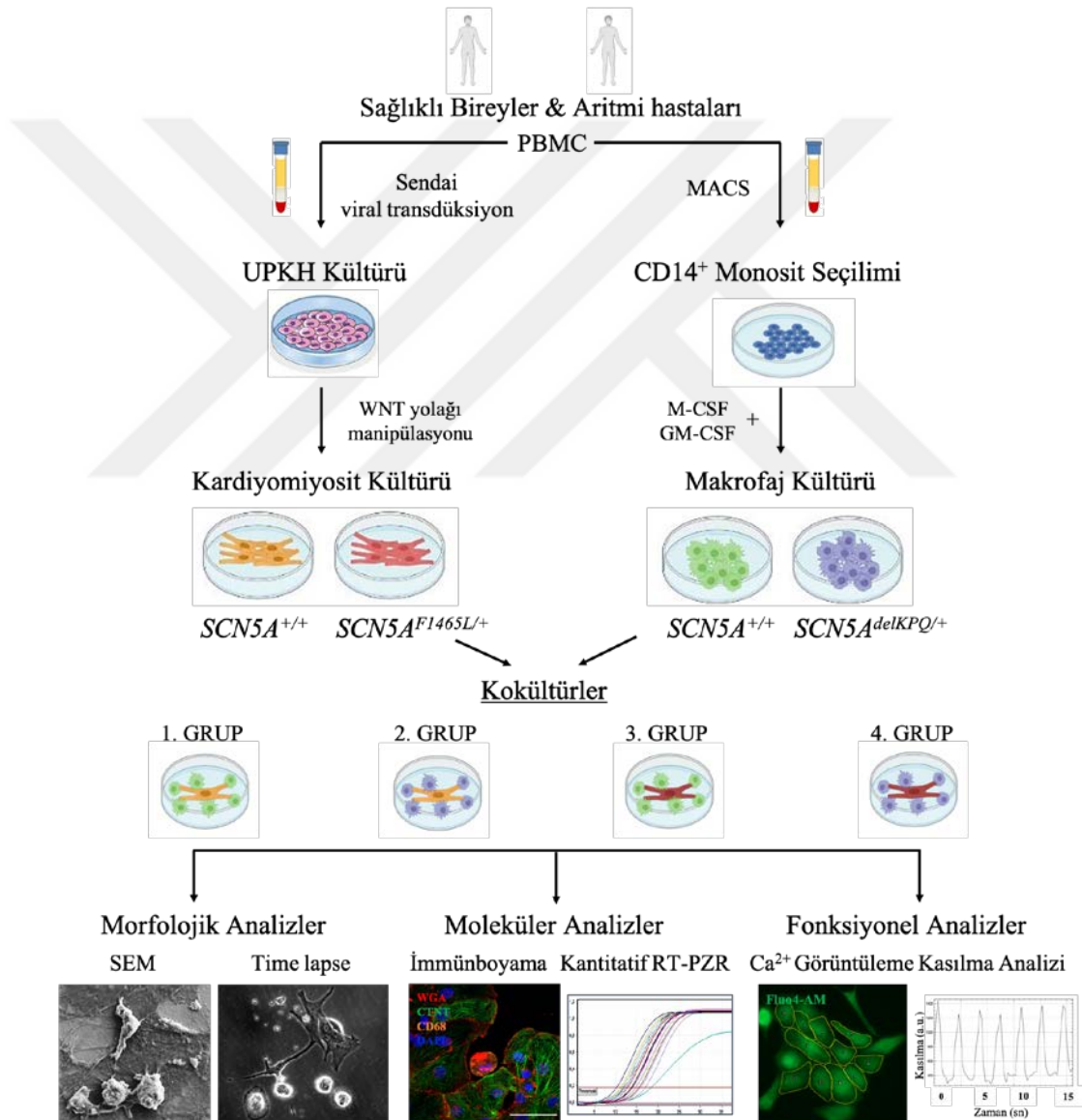
Şekil 6.18 Vahşi tip ve *Casq2*^{-/-} farelerin CX3CR1⁺ kardiyak makrofajlarının kantitatif analizi. Fare kalp kesitlerinde immünfloresans boyamaların sayısal analizi için seçilen (A) CX3CR1⁺ kardiyak makrofajları, (B) makrofajların nukeuslarını ve (C) örtüşen örnek görüntüdeki hücre seçim stratejisi. (D) Vahşi tip ve *Casq2*^{-/-} farelerin kalp dokularında CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların yoğunluğunu gösteren detaylı grafik. N=4. (E) Vahşi tip ve *Casq2*^{-/-} farelerin kalp dokularında CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların total yoğunluğunu gösteren grafik. *** $P<0,0001$. a.u.: arbitrary unit (rasgele birim).

Konjenital taşikardi hastalık modeli olan *Casq2*^{-/-} farelerde CX3CR1⁺ makrofaj yoğunluğunun azalması, bize CX3CR1 ifadeli makrofaj popülasyonundaki azalmanın konjenital aritmi patogenezinde rolü olabileceğini gösterdi.

6.2 *In vitro* Çalışmalarda Elde Edilen Bulgular

Sağlıklı ve konjenital aritmi durumunda, kardiyomiyositler ve makrofajların etkileşimlerini incelemek amacıyla, sağlıklı birey ve *SCN5A*^{F1465L/+} mutasyonu taşıyan

ventriküler taşikardi hastasından uPKH-kökenli kardiyomiyositler üretildi. Sağlıklı bireyler ve *SCN5A^{delKPQ/+}* mutasyonu taşıyan konjenital aritmi hastalarından MACS yöntemi ile izole edilen CD14⁺ monositlerden büyüme faktörleri varlığında makrofajlar elde edildi. Makrofajlar ve kardiyomiyositlerin fonksiyonel ve moleküler karakterizasyonları yapıldıktan sonra, bu hücreleri içeren *in vitro* kokültürler oluşturularak hücreler arasındaki morfolojik, moleküler ve fonksiyonel etkileşimler incelendi. Tez çalışması süresince izlenen *in vitro* deney basamaklarının özeti Şekil 6.19'da belirtilmiştir.



Şekil 6.19 Tez çalışmasının *in vitro* deney dizaynının grafiksel özeti. Ca²⁺: Kalsiyum iyonu. Time lapse: Hızlandırılmış çekim. MACS: Manyetik aktive edici hücre ayrıştırma. M-CSF: Makrofaj koloni stimüle edici faktör. GM-CSF: Granülosit

makrofaj koloni stimüle edici faktör. RT-PZR: Reverse (Tersine) transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu. PBMC: Periferik kan mononükleer hücreler. SEM: Taramalı (Scanning) elektron mikroskobu.

6.2.1 Sağlıklı ve hasta bireylerden kan örneklerinin toplanması

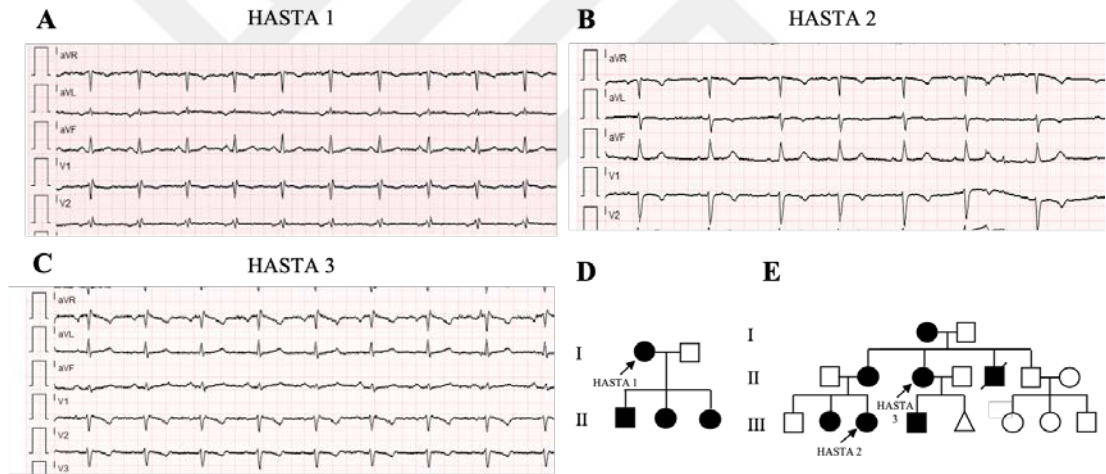
Kontrol grubu olarak öncelikle 28 yaşında sağlıklı bir kadından (Kontrol 1) uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) hattı elde edildi ve kontrol amaçlı kardiyomiyosit kültürü elde etmek için bu hat kullanıldı. Kontrol 1 kanından saflaştırılan monosit hücreleri paralel deneylerde makrofaj farklılaştırması için de kullanıldı. İkinci kontrol hücre grubu oluşturması amacıyla, 24 yaşında kadın sağlıklı bireyden (Kontrol 2) alınan monosit hücreleri makrofajlara farklılaştırıldı. Ventriküler taşikardi hastası *SCN5A^{F1465L/+}* mutasyonu taşıyan 42 yaşında kadın hastadan (Hasta 1) elde edilen uPKH-kökenli kardiyomiyositler bu tez çalışmasında *in vitro* taşikardi modeli olarak kullanıldı. Bununla birlikte, *SCN5A^{delKPQ/+}* heterozigot mutasyon taşıyan 24 yaşında (Hasta-2) ve 47 yaşındaki (Hasta-3) Uzun QT Sendromu-3 (UQTS-3)/Brugada Sendromu tanılı kadın hastaların kanından saflaştırılan monosit hücreleri hasta grubu makrofaj farklılaştırması için kullanıldı. Kolektif olarak, bu çalışmada kullanılan kardiyomiyosit ve makrofaj hücrelerinin köken aldığı bireylerin, hastalıkları, mutasyon isimleri, yaş ve cinsiyet gibi demografik bilgileri Tablo 6.2’de verilmiştir.

Tablo 6.2 Tez çalışması kapsamında kullanılan hücrelerin demografik tablosu. UQTS-3: Uzun QT Sendromu-3. uPKH: uyarılmış pluripotent kök hücre.

Örnek	Hücre tipi	Hasta Teşhisi	Mutasyon	Yaş - Cinsiyet
Hasta 1	uPKH-kökenli kardiyomiyosit	Ventriküler Taşikardi	<i>SCN5A</i> p.F1465L (c.4393T>C)	42 yaşında kadın
Hasta 2	Makrofaj	UQTS-3	<i>SCN5A</i> p.1505-1507delKPQ	24 yaşında kadın
Hasta 3	Makrofaj	UQTS-3/Brugada sendromu	<i>SCN5A</i> p.1505-1507delKPQ	47 yaşında kadın
Kontrol 1	uPKH-kökenli kardiyomiyosit	Sağlıklı	Mutasyon yok	28 yaşında kadın
	Makrofaj			33 yaşında kadın

Kontrol 2	Makrofaj	Sağlıklı	Mutasyon yok	24 yaşında kadın
-----------	----------	----------	--------------	------------------

Tüm hasta bireylere ait EKG verileri ve pedigree analizleri Tablo 6.3'te ve Şekil 6.20'de verilmiştir. Hasta 1 EKG verisinde, bireyin ventriküler taşikardi hastası olduğunu gösteren junctional ektopik taşikardi (JET) modeli gözlenmektedir (Şekil 6.20) ve EKG parametrelerinin analizinde RR intervali ortalaması normal değer alt sınırına (600-1200 ms) yakın tespit edilmiştir (Tablo 6.3) (209). Hasta 2 ve 3 EKG verilerinde ölçülen QT/QTc değerlerinin normalin (kadında 360/460 ms) üzerinde tespit edilmesi bu hastaların uzun QT sendromuna sahip olduklarını göstermiştir (Tablo 6.3) (210).



Şekil 6.20 Hasta grubu EKG bulguları. (A) Hasta 1, (B) Hasta 2 ve (C) Hasta 3'ün EKG verileri. (D) Hasta 1'e ait pedigree analizi. (E) Hasta 2 ve 3'e ait pedigree analizi. Probandlar okla gösterilmiştir.

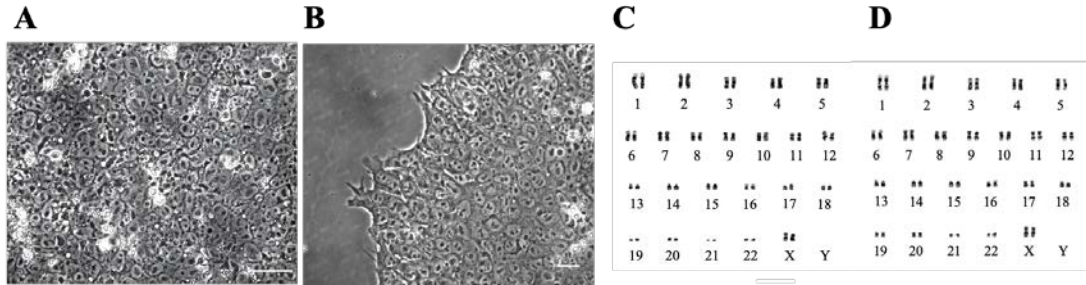
Tablo 6.3 Hasta grubu EKG verileri. ms: milisaniye. BPM: Beat per minute.

	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3
Kalp atım hızı	86 BPM	63 BPM	72 BPM
PR intervali	148 ms	166 ms	182 ms
QRS süresi	85 ms	100 ms	102 ms
QT/QTc	344/387 ms	464/471 ms	429/453 ms

Ortalama RR intervali	695 ms	948 ms	830 ms
QTcB	412 ms	476 ms	470 ms
QTcF	388 ms	472 ms	456 ms

6.2.2 Uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) kültürü karakterizasyonu

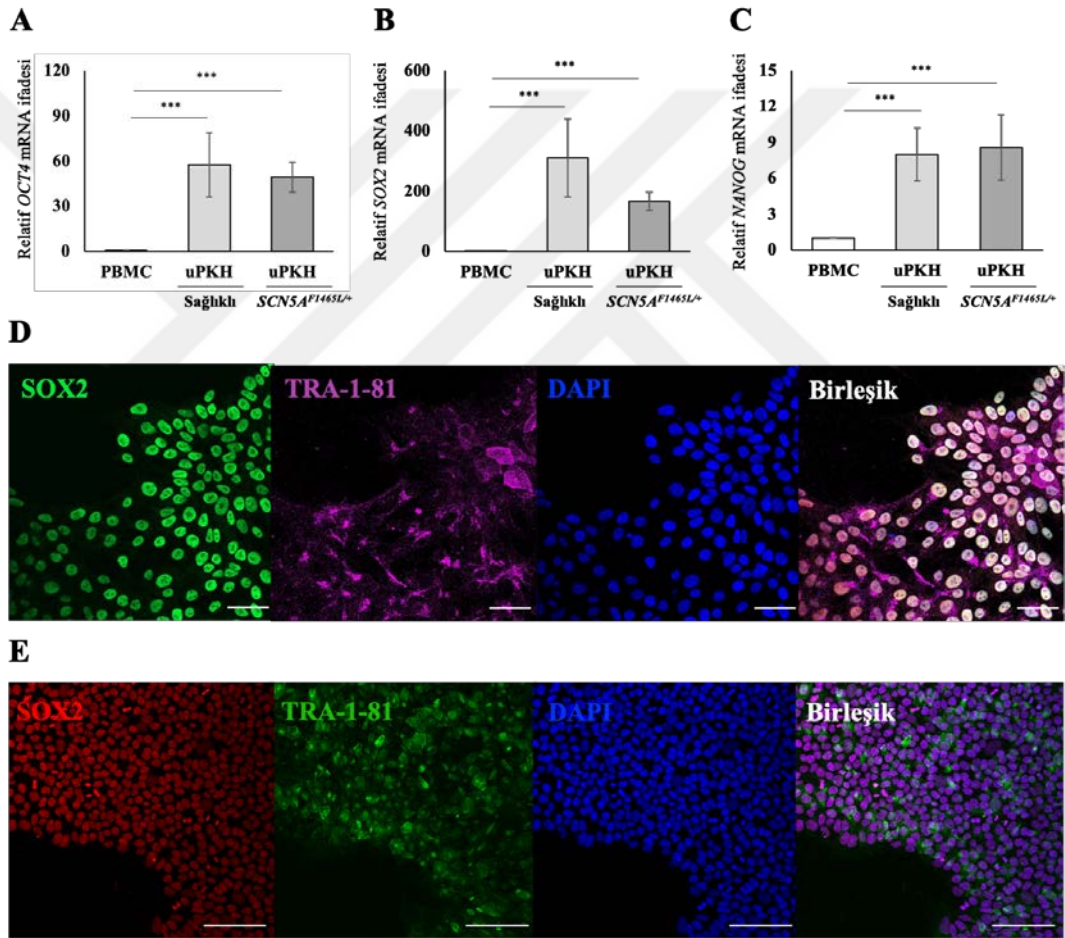
SCN5A^{F1465L/+} mutasyonu kaynaklı ventriküler taşikardi hastası ve herhangi bir immün sistem hastalığı veya kalp rahatsızlığı bulunmayan sağlıklı bireyin PBMC hücreleri yeniden programlanarak uPKH hattı elde edildi ve kardiyomiyosit farklılaşması gerçekleştirildi. Sağlıklı ve hasta kökenli uPKH kolonilerinin ışık mikroskopi gözlemlerinde, kolonilerin pasaj sonrası 3. günde tipik embriyonik kök hücreye benzer profil sergilediği gözlemlendi (Şekil 6.21 A, B). Yeniden programlama sırasında hücre genomunda makro düzeyde kromozomal bozukluklar gelişebilmektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan uPKH'lerinin karyotip analizi sonucunda herhangi bir yapısal ya da sayısal kromozomal bir anomali gözlenmemiştir (Şekil 6.21 C, D).



Şekil 6.21 Uyarılmış pluripotent kök hücre kültürlerinin ışık mikroskopi görüntüleri ve karyotip analizi. (A) Sağlıklı ve (B) *SCN5A*^{F1465L/+} mutasyonu taşıyan ventriküler taşikardi hastası bireye ait uPKH kültürlerinin ışık mikroskopi görüntüleri. (C) Sağlıklı ve (D) hasta bireyin uPKH'lerinin karyotip analizi. N=3. uPKH: Uyarılmış pluripotent kök hücre. Ölçek çubuğu: 50 µm.

Uyarılmış pluripotent kök hücrelerin pluripotent özellikleri, mRNA ve protein seviyesinde incelenerek moleküler karakterizasyonları yapıldı. Embriyonik kök hücre belirteç genleri *OCT4*, *SOX2* ve *NANOG* mRNA ifade seviyeleri sağlıklı ve hasta kökenli olması farketmeksizin uPKH'lerinde, köken aldıkları somatik hücrelere

(PBMC) göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulundu ($P<0,0001$, Şekil 6.22 A, B, C). Bununla birlikte, sağlıklı (Şekil 6.22 D) ve hasta kökenli uPKH kolonilerinde (Şekil 6.22 E), embriyonik kök hücrelerde nükleer olarak ifade edilen SOX2 transkripsiyon faktörü ile yüzey belirteci TRA-1-81 proteinleri, immünohistokimyasal boyamalar ile tespit edildi. Ek olarak çekirdek içerisinde bulunan SOX2 transkripsiyon faktörünün, çekirdek boyası olan DAPI ile kolokalize oldukları gözlemlendi (Şekil 6.22 D, E).



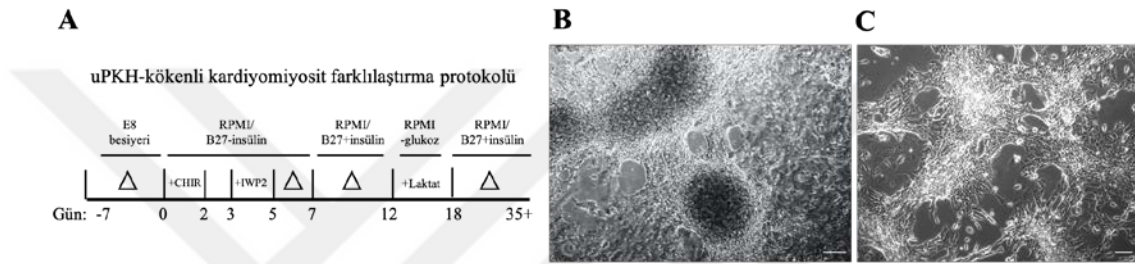
Şekil 6.22 Uyarılmış pluripotent kök hücre kültürlerinin moleküler karakterizasyonu. Sağlıklı ve *SCN5A*^{F1465L/+} mutasyonu taşıyan hasta kökenli uPKH'lerinde (A) *OCT4*, (B) *SOX2*, (C) *NANOG* genlerinin mRNA düzeyinde incelenmesi. (D) Sağlıklı ve (E) hasta bireyin uPKH kolonilerinde *SOX2* ve TRA1-81 proteinlerinin floresan mikroskop görüntüleri. N=3. DAPI: Çekirdek boyası. uPKH: Uyarılmış pluripotent kök hücre. Ölçek çubuğu: 50 µm. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiştir. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$.

6.2.3 Uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) kültürlerinden kardiyomiyosit farklılaştırması ve karakterizasyonu

Literatürde uPKH kültürlerinden kardiyomiyosit farklılaştırması için, birçok yöntemden faydalanılmaktadır. Embriyonik gelişimin kardiyak farklılaşma sürecinde görevli sinyal yollarının manipülasyonunu replike eden bu yöntemlerde, %45-98 arasında kardiyomiyosit hücre farklılaştırma ve saflaştırma verimi sağlanmaktadır (82, 84). En yüksek oranda ve tutarlı olarak kardiyak farklılaşma sağlayan metot, Lian ve arkadaşlarının 2013 yılında tanımladığı WNT sinyal yolağı regülasyonundan faydalandığı iki farklı besiyeri ve küçük molekülden faydalanan, %98 oranında kardiyomiyosit verimi sağlayan yöntemdir (82, 211). Bu tez çalışmasında, sağlıklı ve *SCN5A^{F1465L/+}* mutasyonu taşıyan hasta kökenli uPKH'lerini bu yöntemle kardiyomiyositlere farklılaştırdık (Şekil 6.23 A). Bu süreçte karşılaştığımız farklılaşmama ve apoptoz gibi problemler yüzünden, protokolde kullanılan küçük moleküllerin konsantrasyonları ve kültüre eklenme süreleri ile ilgili optimizasyonlar gerçekleştirdik. Kardiyomiyosit farklılaşmasının ilk 0-1.gün arası 24 saatlik süreyle WNT yolağını aktive etmek ve hücreleri mezodermal yöne farklılaştırmak için CHIR99021 küçük molekülü 10 µM konsantrasyonunda uygulandıktan sonra (211), kültürlerde ciddi oranda ölüm gözlemlendi. Bu nedenle literatürde de sonradan geliştirilen bir çözüm olarak CHIR99021 molekülünün konsantrasyonunu 6 µM olacak şekilde azaltarak 1 günlük kültür süresini 2 güne çıkardık ve böylece farklılaşma kültürlerimizdeki hücrelerin canlılıklarını sürdürdüklerini gördük (82). Ayrıca farklılaşmanın 3-5. günleri arası uygulanan WNT yolağını inhibe edici IWP-4 molekülünü uyguladıktan sonra kültürlerde yine hücre ölümü gözlemlendi. Bu nedenle IWP-4 molekülünün eşleniği olan IWP-2 veya IWR-1-endo molekülleri ile farklılaşma sürecine devam edildi. Bu faktörlerin kullanımıyla WNT yolağı inhibisyonu ile görülen hücre ölüm oranı azaldı. Diğer karşılaştığımız sorun ise farklılaşmanın 7. gününün sonunda, normal şartlarda kümeleşerek kasılması beklenen hücrelerin kardiyak hücre profili sergilemediği, hücrelerin tek katmanlı şekilde ve fibroblast benzeri morfolojide olmasıydı. Literatür araştırmamıza göre, kardiyomiyosit farklılaşmasının başlangıç gününde uPKH kültürlerinin yoğunluklarının %75-80'in üzerinde olmamasına karar verildi (84). Tüm bu optimizasyonlar sonucunda Şekil 6.23

A'da tasvir edilen protokol kullanılarak uPKH-temelli kardiyomiyosit farklılaşması sonrasında çeşitli karakterizasyon aşamalarına geçildi.

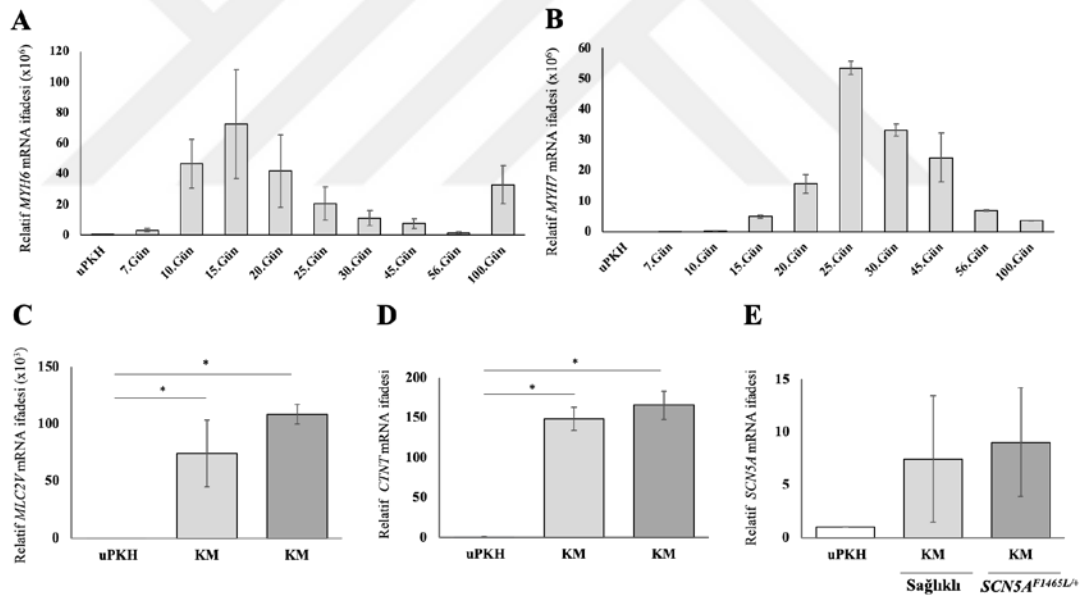
Farklılaşmanın en erken 8, en geç 12. gününde spontan kasılmaları gözlenen sağlıklı (Şekil 6.23 B) ve ventriküler taşikardi hasta (Şekil 6.23 C) kökenli kardiyomiyositlerin morfolojileri ışık mikroskobu ile gün gün takip edildi. Kültürlerde çeşitli sebeplerle kasılmaları duraksayan kardiyomiyositlerin besiyerlerine, 100 nM konsantrasyonda beta-adrenerjik agonist izopreterenol kimyasalı eklenerek kasılmalar gerekli durumlarda stimüle edildi.



Şekil 6.23 uPKH kültürlerinden kardiyomiyosit farklılaştırması. (A) Kardiyomiyosit farklılaştırması zaman çizelgesi. (B) Sağlıklı ve (C) *SCN5A*^{F1465L/+} ventriküler taşikardi kökenli uPKH- kardiyomiyosit kültürlerinin ışık mikroskobu görüntüleri.

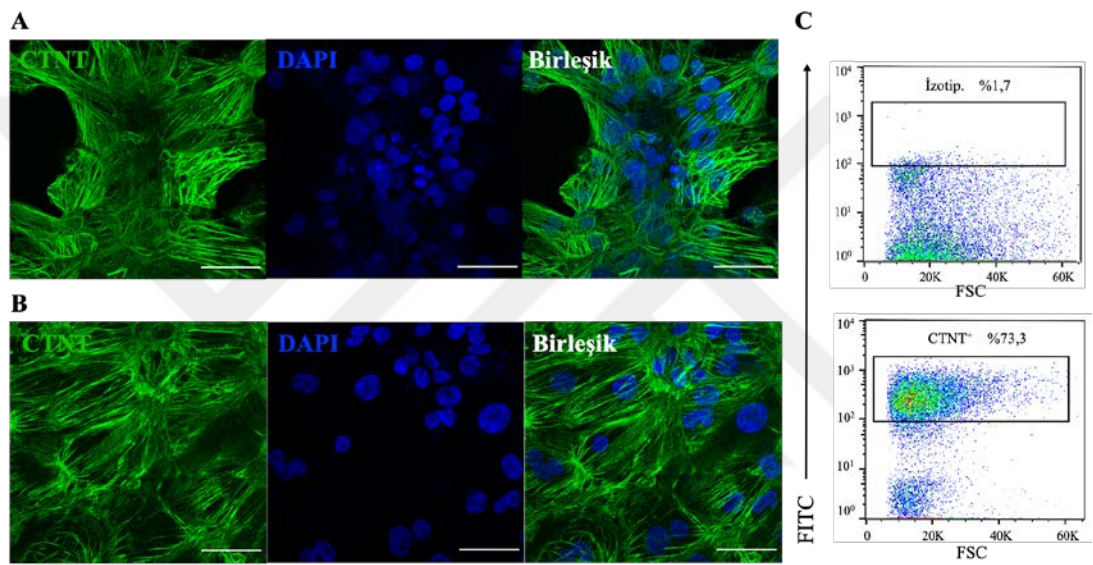
Kardiyomiyositlerin moleküler karakterizasyonu amaçlı, kardiyak hücrelere spesifik *MYH6*, *MYH7*, *MLC2V*, *CTNT* ve *SCN5A* genlerinin mRNA seviyeleri sağlıklı ve hasta kökenli kardiyomiyositlerde kantitatif RT-PZR yöntemiyle incelendi (Şekil 6.23 D-H). Analizler, kontrol amaçlı kullanılan ve bu genleri ifade etmesi beklenmeyen uPKH'lerindeki sonuçlara göre normalize edildi. Öncelikle, kardiyomiyositlerin olgunlaşma seviyeleri, sağlıklı kardiyomiyosit farklılaşma kültürlerinin belirli günlerinde (7-100. gün) yürütülen *MYH6* ve *MYH7* mRNA analizleri ile değerlendirildi (Şekil 6.24 A, B). İnsan kalp gelişiminin erken dönemlerinde *MYH6* gen ifadesinin yükseldiği, kardiyak olgunlaşma sağlandığında *MYH6* gen ifadesinin azalarak *MYH7* gen ifadesinin arttığı bilinmektedir (212). Bu iki gen ifadeleri arasındaki geçiş, uPKH-kökenli kardiyomiyosit kültürlerimizde gerçekleştirdiğimiz kantitatif RT-PZR yöntemiyle doğrulanmıştır (Şekil 6.24 A, B). Farklılaşmanın yirmibeşinci gününden itibaren kardiyomiyositlerde gen ifadesi açısından olgunlaşma görmemiz nedeniyle deneylerimizde otuz-kırkbeşinci kültür günleri arasındaki kardiyomiyositleri kullandık.

Kardiyak kültürlerin otuzuncu gününde kardiyak spesifik genlerin mRNA seviyeleri incelendiğinde, *MLC2V* mRNA ifadeleri sağlıklı ($P=0,0272$) ve hasta ($P=0,0361$) birey kökenli kardiyomiyosit kültürlerinde 0. gün uPKH'lerine göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulundu (Şekil 6.24 C). Bununla birlikte diğer kardiyak spesifik gen olan *CTNT* mRNA ifadeleri, sağlıklı ($P=0,0443$) ve hasta ($P=0,0487$) kökenli kardiyomiyosit kültürlerinde uPKH'lerine göre istatistiksel anlamlı bir şekilde yüksek olarak analiz edildi (Şekil 6.24 D). *MLC2V* ve *CTNT* mRNA seviyeleri sağlıklı ve hasta kökenli kardiyomiyosit kültürleri arasında analiz edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($P=0,3292$, Şekil 6.24 C, $P=0,4112$, Şekil 6.24 D). Kültürlerinde kardiyak yapısal genler *MLC2V* ve *CTNT* mRNA ifadelerinin uPKH'lerine göre istatistiksel anlamlı olarak artış göstermesi, kardiyomiyosit farklılaşmasını doğrulamıştır.



Şekil 6.24 Kardiyomiyosit kültürlerinde kantitatif RT-PZR ile mRNA ifade analizleri. (A) *MYH6*, (B) *MYH7* mRNA ifadelerinin sağlıklı kardiyomiyositlerde, (C) *MLC2V*, (D) *CTNT* ve (E) *SCN5A* mRNA ifadelerinin sağlıklı ve hasta kökenli kardiyomiyositlerde köken aldıkları uPKH'lerine göre normalize edilen kantitatif RT-PCR analizleri. N=3. MYH6: Miyozin ağır zincir 6/α MYH7: Miyozin ağır zincir 7/β. *MLC2V*: *MLC2A/V*: Miyozin hafif zincir 2A atriyal/ventriküler form. *CTNT*: Kardiyak troponin-T. *SCN5A*: Sodyum voltaj kapılı kanalı alfa subuniti 5. Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$.

Kardiyak sodyum iyon kanalı mRNA ifadeleri değerlendirildiğinde ise, sağlıklı ($P=0,0743$) ve hasta ($P=0,0525$) kökenli kardiyomiyosit kültürlerinde *SCN5A* gen ifadeleri, uPKH'lerine göre yüksek bulundu fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 6.24 E). Ayrıca, sağlıklı ve hasta kardiyomiyosit kültürleri arasında da *SCN5A* mRNA ifadesi açısından bir fark gözlenmedi ($P=0,6780$, Şekil 6.24 E). İstatistiksel olarak anlamlı olmayan bu sonuçlar, geniş standart sapmadan kaynaklanabilir bu nedenle ileriki çalışmalarda deney sayısı arttırılmalıdır.



Şekil 6.25 Kardiyomiyosit kültürlerinde immünboyama ve akım sitometrisi. (A) Sağlıklı ve (B) *SCN5A*^{F1465L/+} mutasyonu taşıyan hasta kökenli kardiyomiyositlerde CTNT kardiyak belirteç proteinin immünohistokimyasal boyanmasının floresan mikroskop görüntüleri. N=3. (C) Sağlıklı kardiyomiyosit kültürlerindeki CTNT⁺ hücrelerin akım sitometrisi yöntemi ile kantitatif analizi. N=1. CTNT: Kardiyak troponin-T. DAPI: Çekirdek boyası. FSC: İleri saçılım. FITC: Floresan izotiosyanat. Ölçek çubuğu: 50 μ m.

Kardiyak troponin-T (*CTNT*) gen ifade analizinin yanı sıra bu kardiyak genin kodladığı CTNT proteinin kalitatif ve kantitatif analizleri, immünohistokimyasal hücre boyamaları ve akım sitometrisi ile değerlendirildi (Şekil 6.25). Sağlıklı ve hasta kökenli kültürlerde, kardiyomiyositler immünohistokimyasal boyamalarda CTNT⁺ olarak gözlemlendi (Şekil 6.25 A, B). Ayrıca, konfokal floresan mikroskopunun yüksek magnifikasyonlarında, kültürlerde morfolojik olarak gözlemlenen senkronize kasılmalarla tutarlı olarak kardiyomiyositlerin fonksiyonel sarkomerik yapılar

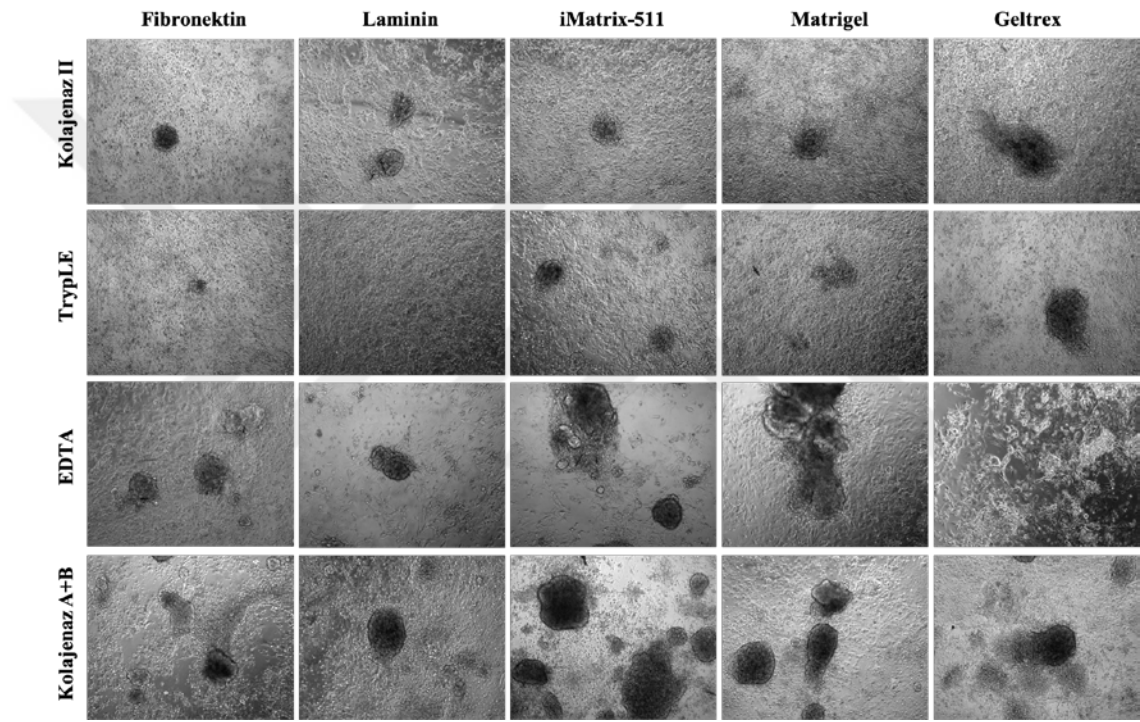
oluşturduğu görüldü (Şekil 6.25 A, B). Sağlıklı kardiyomiyosit kültürlerinin farklılaşma verimi kantitatif açıdan akım sitometrisi ile değerlendirildiğinde, hücrelerde %1,7 oranında spesifik olmayan izotip antikor bağlanması ve %73,3 oranında CTNT⁺ kardiyomiyosit popülasyonu tespit edildi (Şekil 6.25 C). Akım sitometrisi sonucu kardiyomiyosit kültürlerinde CTNT⁺ hücre oranı %71,6 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak, tüm moleküler analizler, bu tez çalışmasında kullanılan kardiyomiyosit farklılaştırma yönteminin kalitatif ve kantitatif açıdan yüksek verimini ortaya koymaktadır.

6.2.4 Uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) kökenli kardiyomiyositlerin yeniden ekimi ve morfolojik gözlemleri

Kardiyomiyositlerin farklılaşma sürecinde uygulanan WNT yolağı inhibisyonunun etkisiyle hücreler kültürde kümeleşerek farklılaşmaktadır (Şekil 6.23 B, C). Bu tez çalışmasında, kardiyomiyositler ile yapılması gereken çeşitli karakterizasyon analizlerini yürütmek ve makrofaj kokültürlerini oluşturmak için, bu hücreleri tekli hücrelere ayrıştırıp yeniden ekerek kültüre etme zorunluluğu doğdu. Kardiyak kültürleri yüksek canlılıkta ayrıştırabilmek amacıyla kardiyomiyositlere çeşitli ayrıştırma ve yeniden ekim protokolleri uygulandı. Bu protokollerde, 15-35. günler arası olgunlaşmamış kardiyomiyositleri, 60-160. günler arası matür kültürlerdeki kardiyomiyosit hücrelerini, Kolajenaz A+B, Kolajenaz II, TrypLE enzimleri ile enzimatik, kalsiyum ve magnezyum gibi divalent katyonları bağlayıcı EDTA ile enzimatik olmayan yollarla ayrıştırdık. Sonrasında hücreleri kardiyak kültürler için sıklıkla tercih edilen Fibronectin, Laminin, iMatrix-511, Matrigel ve Geltex matrisleri üzerine ektik. Kardiyomiyosit hücreleri kasılmaların başlaması açısından gün gün ışık mikroskobu ile incelendi (Şekil 6.26).

Yeniden ekimi yapılan tüm gruplardaki kardiyomiyositlerin yaklaşık iki, üç gün içerisinde fonksiyonel kasılmaları gözlemlendi. Yeniden ekim sonrası ilk gün senkronize atım gösteren kültürler TrypLE - Fibronectin ve TrypLE - Matrigel grupları olarak belirlendi (Şekil 6.26). Kolajenaz II ile ayrıştırılan kültürlerde tritürasyon süresine göre sonuç veren tekli hücre ve küçük kümeler halinde tutunmuş kardiyomiyosit morfolojileri tespit edildi. Hücreler arası bağları etkili bir şekilde kopartacak kadar güçlü bir solüsyon olmayan, fakat etkisi geri dönüşümlü olduğu için tercih edilen

EDTA ile muamele edilen kültürlerde kardiyomiyositler kümeler halinde kaldı. EDTA ile ayrıştırılan hücreler enzimatik yollar kadar fazla zarar görmedikleri için kasılmaların tekrar başlaması yeniden ekim sonrası ilk günde gözlemlendi. TrypLE enzimi ile muamele edilen hücrelerde ise hücreler arası bağların güçlü bir şekilde ayrıştığı tespit edildi ve bu kültürlerde kardiyomiyositler çoğunlukla tek katmanlı tabakalar halinde yapıştı. Kolajenaz A+B kullanılan kültürlerde genel olarak hücre kümeleri şeklinde ayrışma ve tutunma gözlemlendi (Şekil 6.26).



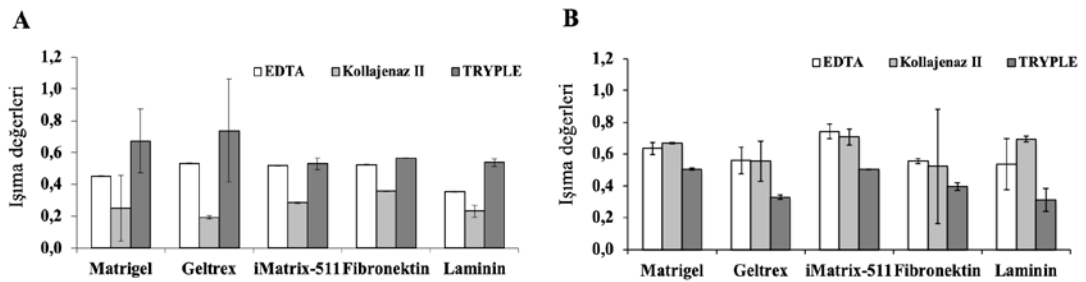
Şekil 6.26 Yeniden ekimi yapılan kardiyomiyosit hücre gruplarında morfolojik analizleri. Görüntüler ışık mikroskopunun 10X magnifikasyonu ayarlarında çekilmiştir.

Gruplar arası tutunma özellikleri değerlendirildiğinde, matriksler arasında herhangi bir morfolojik fark olmamakla birlikte, Geltrex matriksine tutunmuş hücrelerde daha fazla kümeleşmiş ve matrikse gömülmüş hücre grupları görüntülendi (Şekil 6.26).

6.2.5 Yeniden ekimi yapılan kardiyomiyositlerin canlılık analizi

Kardiyomiyositleri güçlü enzimatik veya mekanik ayrıştırmalara tabi tuttuğumuz için, bu enzimlerin kültür canlılıklarını etkileyebileceğini varsayarak yeniden ekim sonrası 3. günde MTT hücre canlılık analizi gerçekleştirdik. Erken gün kardiyomiyosit gruplarında, spektrofotometre ışıma sonuçlarında en yüksek canlılığa sahip kültürler TrypLE+Geltrex ve TrypLE+Matrigel kullanılan gruplar olarak tespit edildi (Şekil 6.27 A). İlginç bir şekilde, Geltrex'e ekilen Kolajenaz II ile ayrıştırılmış hücreler, tüm gruplar arasında en düşük canlılığı gösterdi (Şekil 6.27 A).

Yeniden ekimi yapılan 60-150. kültür günleri arasındaki matür kardiyomiyosit hücrelerinde, spektrofotometre ışıma sonuçlarında en yüksek canlılığa sahip kültür Kolajenaz II - iMatrix-511 grubu olarak belirlendi. İlginç olarak en yüksek canlılığa sahip gruplar, Kolajenaz II enzimi kullanılan hücrelerdi. Bu sonuç bize matür kardiyomiyositleri en az hasara yol açarak ayrıştırmak için Kolajenaz II enzimin kullanılabileceğini göstermiştir. Olgunlaşmamış kardiyomiyositlerin MTT analizi sonuçlarının tersi olarak ise TrypLE enzimi ile muamele edilen matür kültürlerde canlılık en düşük değere sahipti (Şekil 6.27 B). Bu veriler, yeniden ekimi yapılan kardiyomiyositlerin ayrıştırılmasında, hücre olgunluğuna bağlı olarak yapılacak enzim seçiminin önemini göstermektedir.



Şekil 6.27 Yeniden ekimi yapılan kardiyomiyosit hücre gruplarının MTT canlılık analizi. (A) Erken ve (B) Geç gün kardiyomiyosit kültürlerinde yeniden ekim sonrası 3.gün MTT canlılık analizi sonuçları spektrofotometre ışıma değerlerini gösteren grafikler. Nm: nanometre.

6.2.6 Yeniden ekimi yapılan kardiyomiyositlerde immünboyamalar ve hücre skoru belirleme

Yeniden ekim protokolleri içerisinde hangi enzim - matriks kombinasyonu ile daha fazla oranda kardiyomiyosit tutunması sağlandığını belirlemek amacıyla, kardiyak hücre sayımı sayıldı. Hücre ayrıştırması yapılan erken (Şekil 6.28 A) ve geç gün (Şekil 6.29 A) kardiyomiyositlerin yeniden ekim sonrası 14. kültür günlerinde yapılan kardiyak hücre sayımı kültürlerde immünboyama protokolü sonrasında gerçekleştirildi. Tüm gruplarda CTNT ve DAPI çift pozitif immünreaktivite gösteren hücre sayımı ile kardiyomiyosit skorlaması yapıldı. Erken gün kardiyomiyosit gruplarında ortalama 2525 ± 932 hücre (minimum 1005, maksimum 4984), geç gün kardiyomiyosit gruplarında ortalama 1789 ± 607 hücre (minimum 611, maksimum 2544) sayıldı (Tablo 6.3, Tablo 6.4). Erken gün kardiyomiyosit gruplarının hücre skorları, %84-91 arasında hesaplandı ve gruplar arasında en yüksek kardiyomiyosit skorunun, TrypLE - Laminin ($\%91,09 \pm 4,09$) ve TrypLE - Fibronektin ($\%90,42 \pm 3,94$) gruplarında olduğu tespit edildi (Şekil 6.28 B, Tablo 6.4). Bu iki grubun diğer gruplar ile istatistiksel karşılaştırması sonucu gösterdikleri artış anlamlı olarak belirlendi ($P < 0,05$).

Tablo 6.4 Yeniden ekimi yapılan erken gün kardiyomiyosit gruplarında sayılan hücre sayıları ve KM skorları.

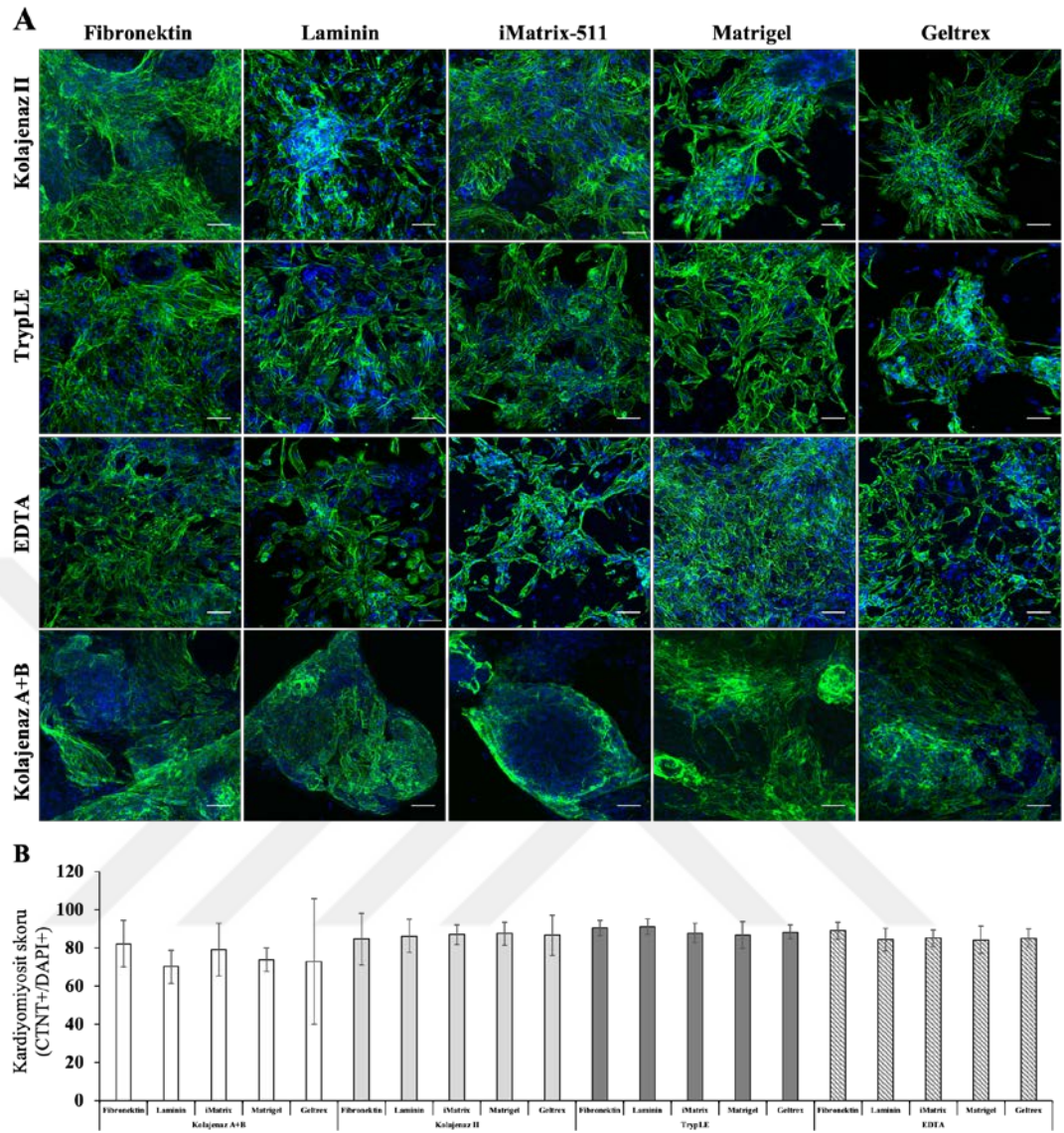
Yeniden ekim grupları		Hücre sayıları	KM Skoru
Kolajenaz A+B	Fibronektin	2423	$82,01 \pm 12,20$
	Laminin	2397	$70,18 \pm 8,69$
	iMatrix-511	2544	$79,07 \pm 13,75$
	Matrigel	2442	$73,79 \pm 6,15$
	Geltrex	1163	$72,96 \pm 32,99$
Kolajenaz II	Fibronektin	2945	$84,63 \pm 13,44$
	Laminin	2352	$86,25 \pm 8,66$
	iMatrix-511	3692	$86,92 \pm 5,21$
	Matrigel	2959	$87,51 \pm 6,08$
	Geltrex	2918	$86,59 \pm 10,38$
TrypLE	Fibronektin	3415	$90,42 \pm 3,94$
	Laminin	2840	$91,09 \pm 4,09$
	iMatrix-511	3057	$87,69 \pm 5,04$
	Matrigel	4984	$86,80 \pm 7,08$
	Geltrex	2807	$88,31 \pm 3,79$
	Fibronektin	1607	$88,97 \pm 4,57$

EDTA	Laminin	1055	84,40 ± 5,89
	iMatrix-511	1716	85,11 ± 4,34
	Matrigel	1760	84,15 ± 7,16
	Geltrex	1440	85,09 ± 4,92

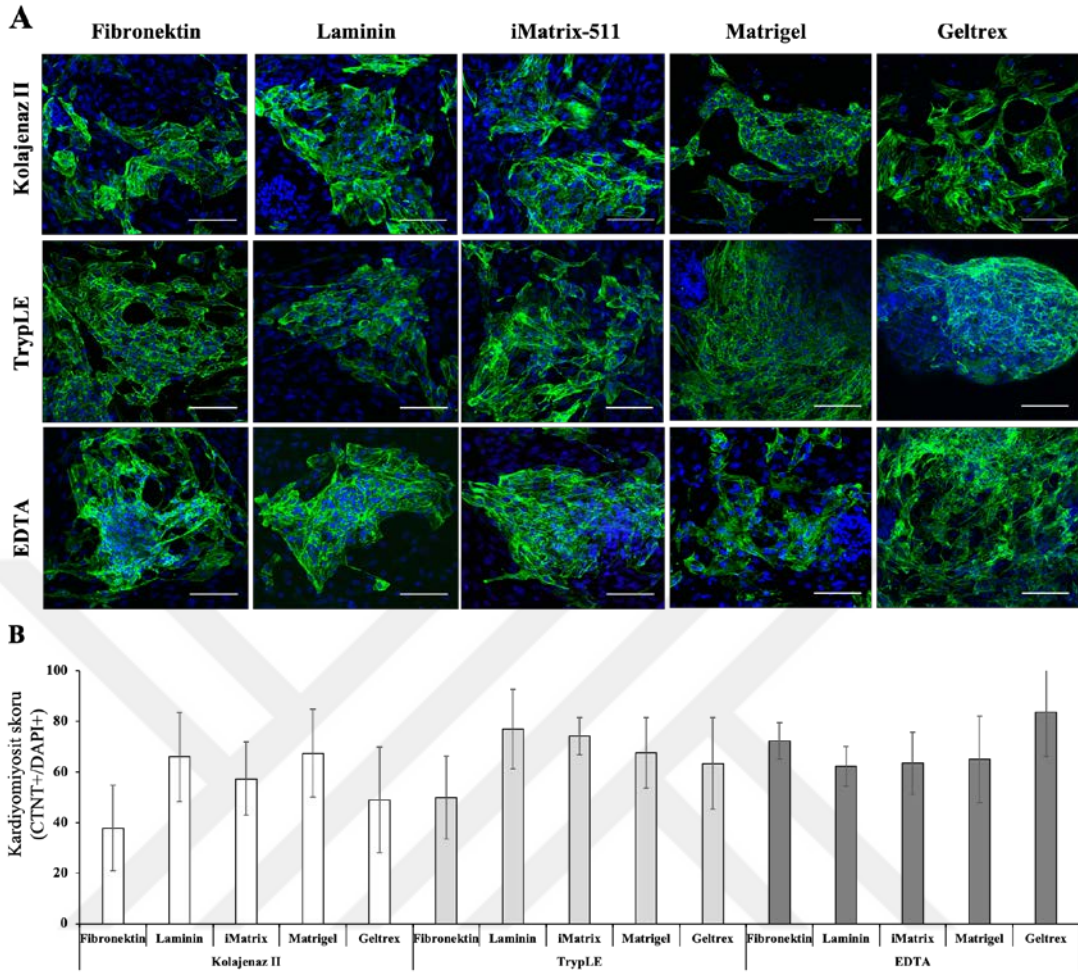
Geç gün kardiyomiyosit gruplarının hücre skorları incelendiğinde kültürlerdeki kardiyomiyosit yüzdelерinin %37-81 arasında olduğu tespit edildi. Gruplar arasında gözlenen bu yüksek fark, geç gün kardiyomiyositlerin enzimatik ve enzimatik olmayan ajanlar ile ayrıştırılması sonucu yüksek varyasyondan kaynaklanmaktadır. Geç gün kardiyomiyosit grupları arasında en yüksek kardiyomiyosit skoru, 83,68 ± 17,74 değerine sahip EDTA - Geltrex grubu olarak belirlendi. Önemli olarak, erken gün hücre skoru sonuçlarına benzer olarak ikinci en yüksek skor TrypLE - Fibronektin (76,90 ± 15,74) uygulanan kültür olarak tespit edildi (Şekil 6.29 B, Tablo 6.5). En düşük hücre skoru Kolajenaz II ile ayrıştırılan gruplara ait olduğu analiz edildi (Tablo 6.5). En yüksek kardiyomiyosit skoruna sahip grupların diğеr gruplar ile istatistiksel karşılaştırması sonucu gösterdikleri artış anlamlı olarak belirlendi ($P<0,05$).

Tablo 6.5 Yeniden ekimi yapılan geç gün kardiyomiyosit gruplarında sayılan hücre sayıları ve KM skorları.

Yeniden ekim grupları		Hücre sayıları	KM Skoru
Kolajenaz II	Fibronektin	2423	37,82 ± 16,92
	Laminin	2397	65,92 ± 17,53
	iMatrix-511	2544	57,26 ± 14,45
	Matrigel	2442	67,38 ± 17,41
	Geltrex	1163	49,03 ± 20,86
TrypLE	Fibronektin	1838	49,90 ± 16,30
	Laminin	2289	76,90 ± 15,74
	iMatrix-511	2156	64,22 ± 7,30
	Matrigel	2064	67,48 ± 13,92
	Geltrex	1791	63,39 ± 17,97
EDTA	Fibronektin	1309	72,22 ± 7,13
	Laminin	1006	62,12 ± 7,83
	iMatrix-511	1320	63,41 ± 12,13
	Matrigel	1494	64,97 ± 17,15
	Geltrex	611	83,68 ± 17,74



Şekil 6.28 Yeniden ekimi yapılan erken gün kardiyomiyosit hücre gruplarının analizi. Tüm gruplara ait (A) CTNT⁺ (yeşil) ve DAPI⁺ (mavi) hücrelerin immünboyama görüntüleri ve (B) Kardiyomiyosit skorlarını gösteren grafik. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiştir.



Şekil 6.29 Yeniden ekimi yapılan geç gün kardiyomiyosit hücre gruplarının analizi. Tüm gruplara ait (A) CTNT⁺ (yeşil) ve DAPI⁺ (mavi) hücrelerin immünboyama görüntüleri ve (B) Kardiyomiyosit skorlarını gösteren grafik. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiştir.

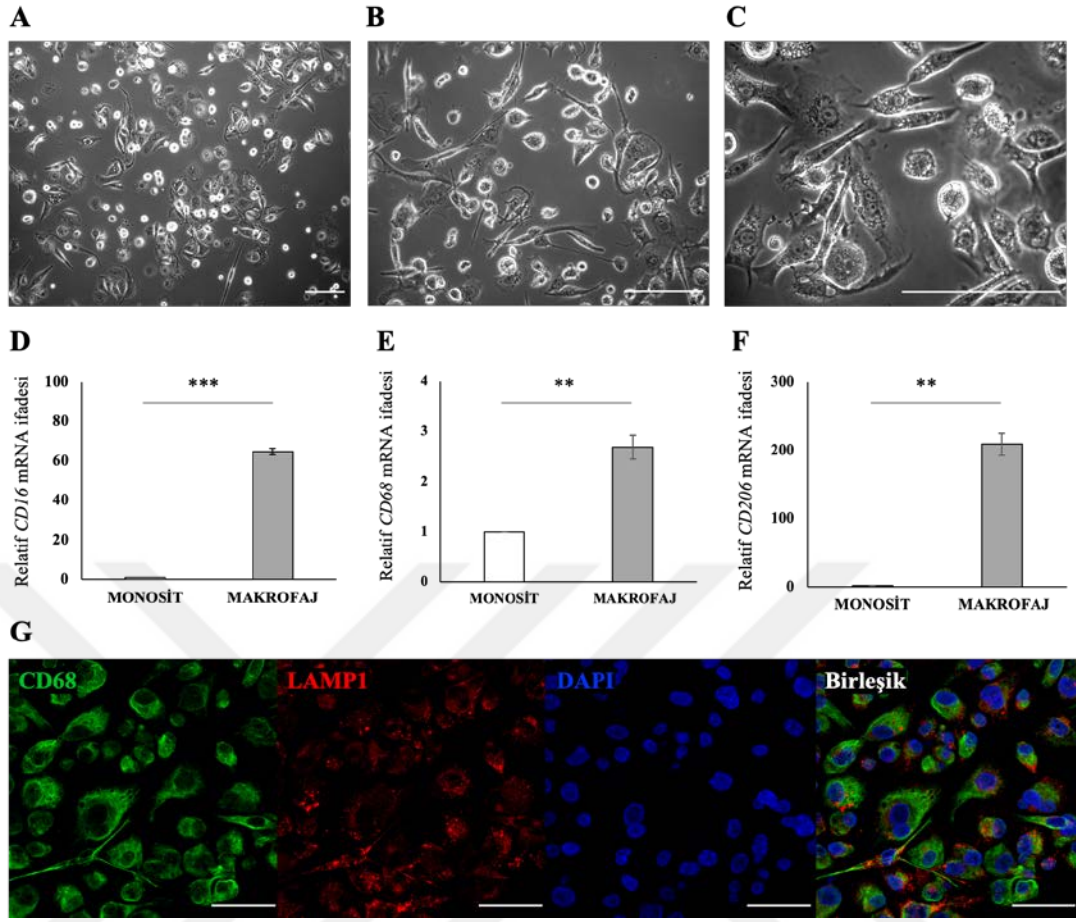
Tüm yeniden ekim sonrası analizler değerlendirildiğinde tekli kardiyomiyosit kültürleri oluşturmak üzere, en güçlü ayrıştırma özelliği ve canlılık analizi sonucu gösteren TrypLE enzimiyle ayrıştırılmış gruplar, aynı zamanda en yüksek hücre skoruna sahipti. Bu nedenle bu aşamadan sonraki kardiyomiyosit yeniden ekim işlemlerimize TrypLE enzimi ile devam ettik. Matriks olarak ise kokültürlerde kardiyomiyositler makrofaj ile birleşeceği için her iki hücre tipini de destekleyen bir matriks olan fibronectin matriksi kullandık (213). Bu nedenle kokültür grubu setlerimizi oluştururken uyguladığımız enzim - matriks kombinasyonu TrypLE - Fibronectin olarak belirlendi.

Kardiyomiyositlerin yeniden ekim protokolleri ile eş zamanlı olarak, THP-1 monosit hücre hattı kullanılarak makrofaj kültürü eldesi optimizasyonları gerçekleştirildi.

6.2.7 THP-1 monosit hücre hattı kökenli makrofaj kültürlerinde optimizasyonlar

THP-1 monosit hücre hattı literatürde insan makrofaj kökenli hücre çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (194, 214, 215). THP-1 hücre hattı, immortalize kanser hücre hattı olması sebebiyle bize yüksek sayıda makrofaj eldesi sağladı, bu nedenle çeşitli immünboyamalar ve kantitatif RT-PZR deneylerinin optimizasyonunda bu hattan elde edilen makrofajlar kullanıldı ve bazı ön incelemeler yapıldı. THP-1 monosit kökenli makrofaj kültürleri PMA molekülü ile farklılaştırıldıktan sonra, literatürde raporlanmış morfolojilerle benzerlik gösteren makrofaj hücreleri gün gün ışık mikroskopunda incelendi (Şekil 6.30 A-C).

THP-1 kökenli makrofaj kültürlerinde makrofaj spesifik genler olan *CD16* ($P=0,0003$), *CD68* ($P=0,0096$) ve *CD206* ($P=0,003$) mRNA ifadelerinin, THP-1 monosit hücrelerine oranla istatistiksel anlamlı şekilde yüksek olduğu kantitatif RT-PZR analizi sonucu tespit edildi (Şekil 6.30 D-F). THP-1 makrofajların immünboyamaları için genel makrofaj belirteci olarak kabul edilen CD68 proteinini ve lizozomik LAMP1 proteinini tanıyan antikorlar kullanıldı. CD68 antikorunun doz ve süre optimizasyonunun yapıldığı bu deneyde, makrofaj spesifik CD68 proteinin ifadesinin ve lizozom organelinin hücre içi yoğunluklarının yüksek oranda gözlenmesi, farklılaştırdığımız hücrelerin makrofaj karakterine uygun olduğunu göstermiştir (Şekil 6.30 G). THP-1 kanser monosit hücre hattından elde ettiğimiz makrofajlar, genetik kökeni sebebiyle tezin araştırma sorusu ve hipotezine uygun olmaması nedeniyle optimizasyon çalışmaları dışında bu hücre hattı tez kapsamında kullanılmamıştır.

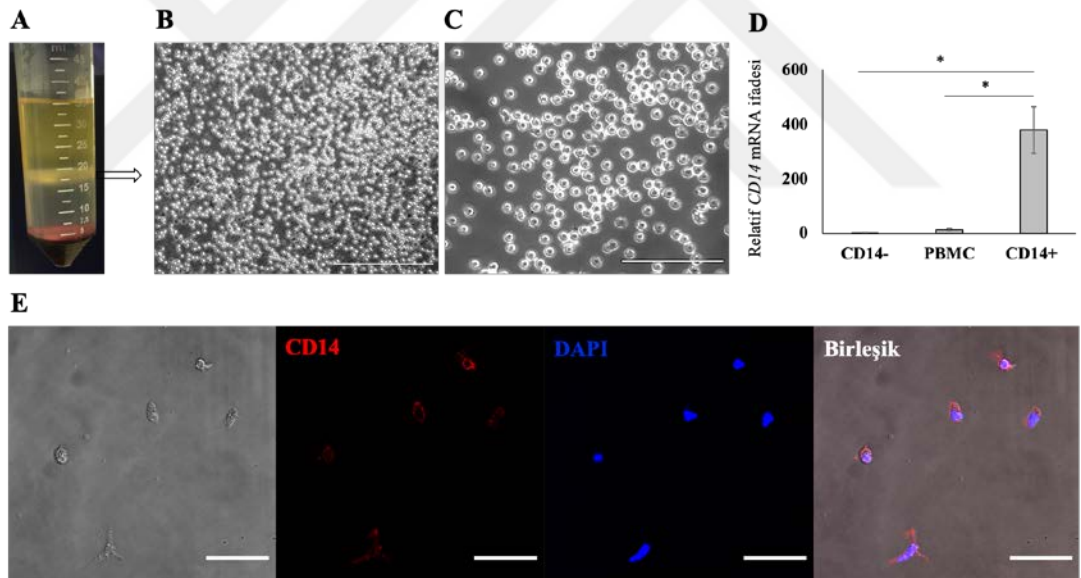


Şekil 6.30 THP-1 hücre hattından farklılaştırılan makrofajların karakterizasyonu. 8. gün THP-1 makrofajlarının (A) 10X, (B) 20X, (C) 40X magnifikasyonda kaydedilmiş ışık mikroskobu görüntüleri. THP-1 makrofajlarının monositlere oranla (D) *CD16* (E) *CD68* (F) *CD206* mRNA ifade analizlerini gösteren grafikler. (G) anti-CD68 ve anti-LAMP1 antikorları ile işaretlenmiş THP-1 makrofajlarının immünboyaması. Ölçek çubuğu: 25 μ m. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiştir. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

6.2.8 Manyetik ayırıştırma yöntemiyle insan monositlerinin saflaştırılması ve karakterizasyonu

Bu tez çalışmasında gönüllü olan bireylerden, heparinli tüpe alınan 10 ml venöz kan örneğinden Ficoll-Paque yöntemi ile PBMC hücrelerini içeren bulutsu tabaka ayırıştırıldı (Şekil 6.31 A). Bu tabakadan yaklaşık 10×10^6 PBMC hücresi elde edildi ve bu hücrelerden manyetik aktive edici hücre ayırıştırma (MACS) yöntemi kullanılarak, literatür raporları ile uyumlu şekilde yaklaşık %10 verimle $0,8-1,2 \times 10^6$ $CD14^+$ monosit hücresi saflaştırıldı (129). $CD14^+$ monosit hücreleri makrofajlara farklılaştırılmadan önce bazı karakterizasyon deneyleri amacıyla uygun hücre kaplarına ekildi ve kültürü

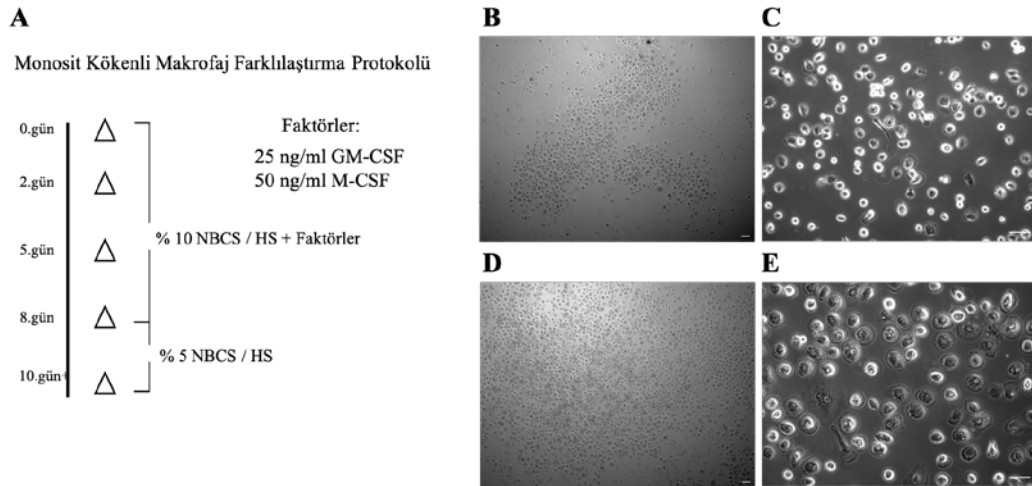
yapıldı (Şekil 6.31 B, C). MACS metodunun etkinliğinin test edilmesi için, ayrıştırılan $CD14^-$ ve $CD14^+$ hücrelerin ve ayrıştırma öncesi total PBMC hücrelerinin mRNA örneklerinden kantitatif RT-PZR analizi gerçekleştirildi. Monosit belirteç geni *CD14* ifadesini incelemek amacıyla yapılan kantitatif RT-PZR sonucu, total PBMC hücrelerinin ($P=0,0425$) ve izole edilen $CD14^+$ hücrelerin ($P=0,0418$) *CD14* gen ifadeleri, $CD14^-$ hücrelere göre normalize edildiğinde istatistiksel anlamlı olarak yükseldi (Şekil 6.31 D). PBMC ve $CD14^-$ hücreler arasında *CD14* mRNA ifadesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmedi ($P=0,0834$, Şekil 6.31 D). MACS yöntemi ile saflaştırılan monositlerin sitoplazmalarının içerisinde yoğun ve homojen bir şekilde *CD14* proteini ifade ettiği immünboyamalar ile doğrulandı (Şekil 6.31 E). Bu sonuçlar $CD14^+$ ifadeli monositleri, MACS izolasyonu sonucunda PBMC süspansiyonundan uygun verimlilikle saflaştırabildiğimizi göstermiştir.



Şekil 6.31 MACS yöntemiyle izole edilen monositlerin karakterizasyonu. (A) Ficoll-Paque yöntemi ile tam kandan ayrıştırılan bulutsu PBMC tabakası. (B) PBMC'lerin kültürde 20X magnifikasyonda ve (C) ayrıştırılan $CD14^+$ monositlerin 40X magnifikasyonda çekilmiş ışık mikroskobu görüntüleri. (D) $CD14^+$ monositlerin ve PBMC'lerin $CD14^-$ hücrelere oranla *CD14* gen ifadesini gösteren kantitatif mRNA ifade analizi grafiği. (E) Monosit kültürünün immünohistokimyasal boyamasının aydınlık alan ve konfokal floresan mikroskobu görüntüleri. APC: Allofitosiyanin. DAPI: çekirdek boyası. PBMC: Peripheral blood mononuclear cells. Ölçek çubuğu: 25 μ m. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiştir. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$.

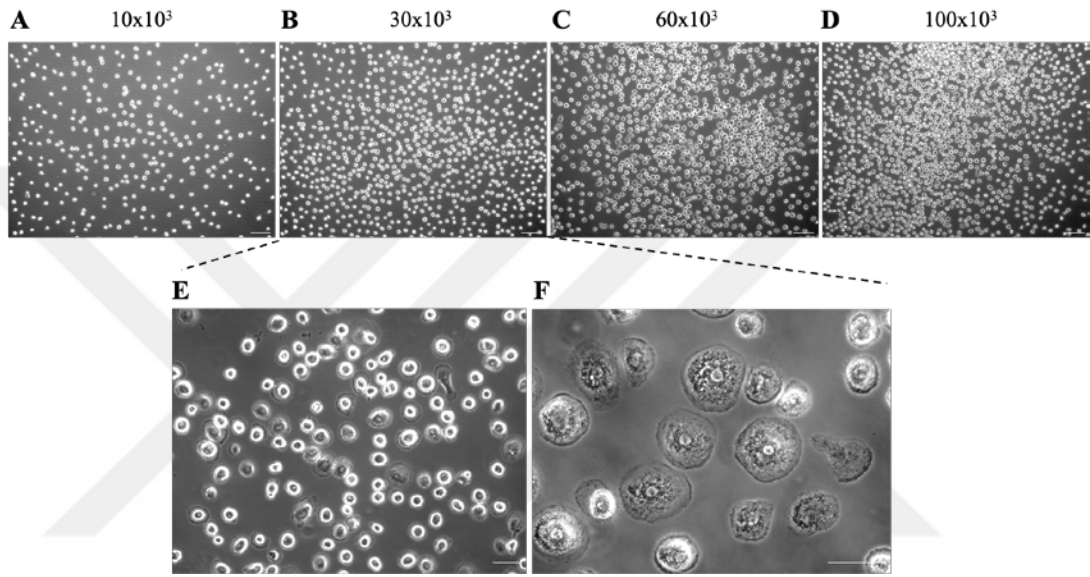
6.2.9 Makrofaj kültürü farklılaştırmasında besiyeri ve hücre sayısı optimizasyonları

Sağlıklı bireylerin PBMC hücrelerinden saflaştırılan CD14⁺ monositler literatürden uyarlanan protokollerden yararlanarak farklılaştırıldı (Şekil 6.32 A). Monositlerin makrofajlara farklılaştırılmasında ilk olarak, besiyerinin içerdiği serum çeşidi ve ekilecek hücre sayısında çeşitli optimizasyonlar yapıldı. Serum çeşidi olarak literatürde sıkça tercih edilmiş iki serum olan AB kan grubuna sahip insan serumu (HS) (Şekil 6.32 B-C) ve yenidoğan buzağı serumu (NBCS) (Şekil 6.32 D-E) %10 oranında makrofaj farklılaştırma besiyerlerine eklendi. Kültür kaplarına cm²'ye 30x10³ sayıda gelecek şekilde ekilen monosit hücreleri, 8 gün boyunca makrofaj farklılaştırmasına bu serumlarla indüklendi. NBCS eklenen besiyerleri ile farklılaştırılan makrofaj kültürlerinde 10-15. günleri arasında, insan serumuna kıyasla canlılığı daha yüksek bir makrofaj kültürü gözlemledik (Şekil 6.32 B-E). Bu sebeple devam eden deneylerde NBCS serumu kullandık. İnsan serumunun kişiye özgü immünolojik özellik göstermesi ve zamansal olarak değişken olabilmesi, makrofaj kültürlerinde standardizasyonu zorlaştıracaklarını da öngörerek NBCS serumunun daha tutarlı sonuçlar vereceğini düşündük.



Şekil 6.32 Makrofaj farklılaştırması ve besiyeri optimizasyonu. (A) CD14⁺ monositlerin makrofaja farklılaştırma protokolünü özetleyen akış şeması. İnsan serumu kullanılarak farklılaştırılmış makrofaj kültüründe (B) 4X ve (C) 20X magnifikasyonlarda kaydedilmiş ışık mikroskopi görüntüleri. NBCS kullanılarak farklılaştırılmış makrofaj kültürü (D) 4X ve (E) 20X magnifikasyonlarda kaydedilmiş 15.gün ışık mikroskopi görüntüleri. Ölçek çubuğu: 25 μ m.

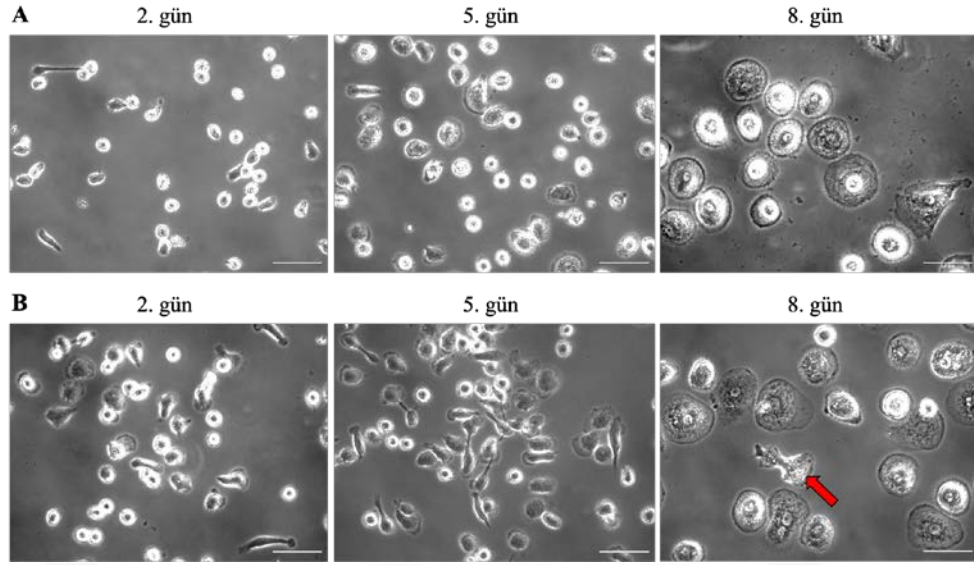
Besiyeri optimizasyonundan sonra makrofaj hücrelerinin ekim için optimal sayısı belirlendi. Kültür kaplarına cm^2 'ye 10×10^3 (Şekil 6.33 A), 30×10^3 (Şekil 6.33 B), 60×10^3 (Şekil 6.33 C) ve 100×10^3 (Şekil 6.33 D) sayılarında monosit ekimi yapıldı. Sekizinci günün sonunda kültürler makrofaj morfolojisi açısından incelendiğinde cm^2 'ye 30×10^3 ekilen CD14^+ monosit grubunun en sağlıklı makrofajlara ve optimal yoğunluğa sahip kültürlerle farklılaştığı gözlemlendi (Şekil 6.33 E, F).



Şekil 6.33 Makrofaj farklılaştırmasında hücre sayısı optimizasyonu. Kültür kaplarına cm^2 'ye (A) 10×10^3 , (B) 30×10^3 , (C) 60×10^3 ve (D) 10×10^4 sayılarında ekilen monosit kültürlerinin 10 X magnifikasyonlarda kaydedilmiş 2. gün ışık mikroskopi görüntüleri. Kültür kaplarına cm^2 'ye 30×10^3 sayıda ekilen monosit kültürlerinin makrofaj farklılaşmasındaki 8. günde (E) 20X ve (F) 40X magnifikasyonlarda kaydedilmiş ışık mikroskopi görüntüleri. Ölçek çubuğu: 50 μm .

6.2.10 Makrofaj kültürlerinde morfolojik incelemeler

Sağlıklı ve $\text{SCN5A}^{\text{delKPQ/+}}$ mutasyonu taşıyan UQTS-3/Brugada sendromu hastalarından elde edilmiş CD14^+ monosit hücreleri, M-CSF ve GM-CSF büyüme faktörleri varlığında makrofajlara farklılaştırıldı (Şekil 6.32 A). Sağlıklı (Şekil 6.34 A) ve hasta (Şekil 6.34 B) kökenli makrofaj kültürlerinin ikinci, beşinci ve sekizinci gün görüntüleri ışık mikroskobu ile kaydedildi. Makrofaj kültürlerinde ilk morfolojik gözlemimiz, M-CSF ve GM-CSF büyüme faktörleri varlığında yürütülen farklılaştırmanın ilk günlerinde hücre proliferasyonunun olduğu.

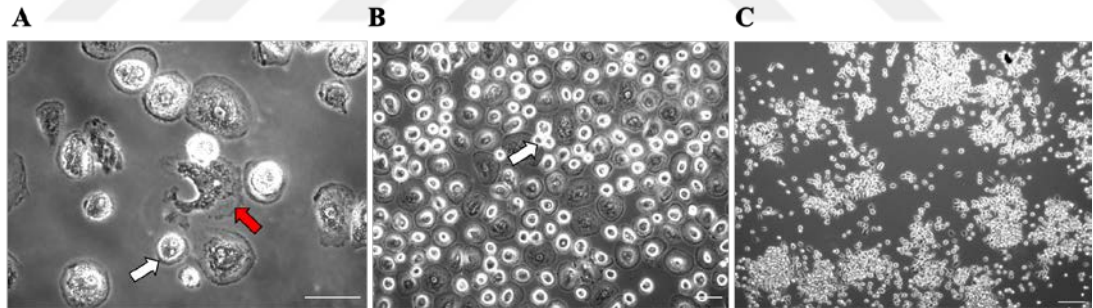


Şekil 6.34 Sağlıklı ve hasta kökenli makrofaj farklılaştırma kültürlerinin ışık mikroskobu görüntüleri. (A) Sağlıklı ve (B) hasta kökenli makrofaj kültürlerinin ikinci, beşinci ve sekizinci günlerde ışık mikroskobu görüntüleri. Ölçek çubuğu: 25 μ m.

Farklılaşmanın çeşitli günlerinde hücre morfolojileri değişmekle birlikte, farklılaşmasını tamamlamış sekizinci gün sağlıklı ve hasta kökenli kültürlerde, sitoplazmik içeriği ve hücre büyüklüğü artmış yuvarlak şekilli (fried-egg shape) hücre morfolojileri gözlenmiştir. Ayrıca hücre membranlarından köken alan uzantılar da makrofajlara özgü karakteristik bir bulgudur (Şekil 6.34). Literatürde M1 fenotipine yönlendirilmiş makrofajların kümesel ve uzantısal hat şeklinde (spindle-shaped) hücreler oldukları, M2 fenotipine yönlendirilmiş ve yönlendirilmemiş naiv M0 fenotipli makrofaj kültürlerinde, heterojen olarak yuvarlak hücrelerin yoğunlukta olduğu ve uzantısal şekilli hücrelerin de bir arada görüldüğü belirtilmiştir (216, 217). Biz kültürlerimizde uzantısal şekilli hücreleri daha çok ikinci ve beşinci gün hasta kaynaklı kültürlerde gözlemledik (Şekil 6.34 B). Bu durum bize hasta kaynaklı monositlerin M1 fenotipine yakın profil sergileyebileceğini, fakat kültürde makrofajlara farklılaşırken M1 özelliklerini kaybederek naiv M0 veya M2 benzeri hücre karakterine sahip olabileceğini düşündürdü. Sağlıklı hasta kökenli makrofaj kültürlerinde gözlemlenen morfolojiler benzer fenotip sergilemekle birlikte literatür ile uyumluluk gösterdi. Kültürlerde, membran uzantıları açıkça gözlenen ve kültürde bir yöne doğru eğilim gösteren, dolayısıyla fagositoz eylemine çok benzeyen

hücrelerle de sıklıkla karşılaşıldı (Şekil 6.34 B, Şekil 6.35 A kırmızı ok). Bunun yanında makrofaj kültürlerinin çeşitli günlerinde, farklılaşmış makrofajlardan daha küçük ve parlak, monosit formuna yakın olduğu tahmin edilen hücreler dikkati çekmiştir (Şekil 6.35 A, B beyaz ok).

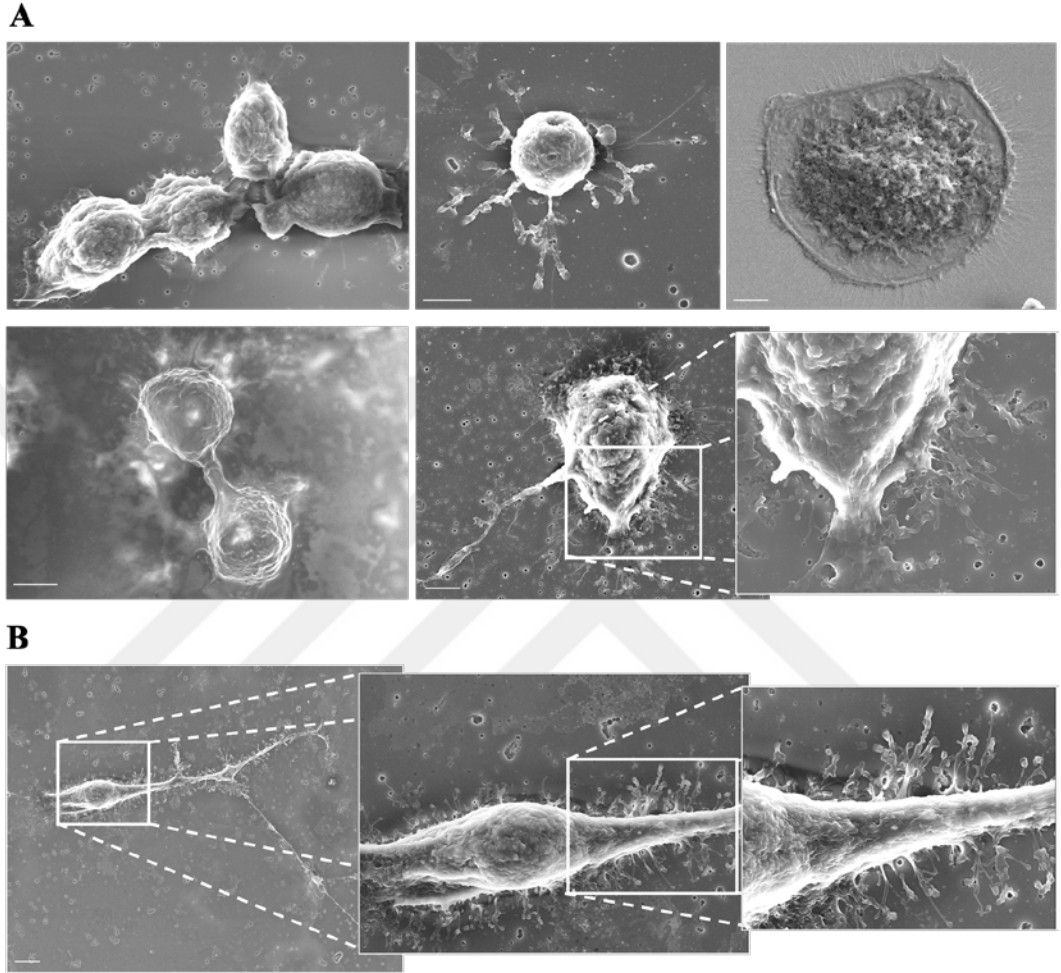
Makrofaj kültürleri ile ilgili bir diğer gözlemimiz, makrofaj hücrelerinin kültür koşullarına bağlı olarak dinamik değişim göstermesidir. Monositlerin makrofajlara farklılaştırılması için 8 gün boyunca uygulanan büyüme faktörleri sonrası, faktörlerin ortamdan çekilmesiyle makrofaj kültürleri en fazla 15 gün kültürde varlıklarını sürdürebilmişlerdir. Diğer bir deyişle, makrofaj kültürlerinde uzun süre (~25 gün) herhangi bir makrofaj stimüle edici faktör olmazsa, hücrelerin tutunma özelliklerini kaybettiği ve monositlere dediferansiyasyon (dedifferentiation) gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 6.35 C). Tüm bu gözlemler doğrultusunda, makrofaj kültürleri ile deneyler, hücrelerin tamamen farklılaştığı sekizinci gününden itibaren onikinci güne kadar olan sürede gerçekleştirildi ve makrofaj kültürlerinin bakımı, kokültürler ile eş zamanlı olması açısından en fazla 2 hafta devam ettirildi.



Şekil 6.35 Makrofaj kültürlerinde değişik morfolojideki hücrelerin incelenmesi. (A) Monosit-makrofaj ara formu ve fagositoz özellik (kırmızı ok) gösteren makrofajları içeren kültürden ışık mikroskobu görüntüsü. (B) Yoğun monosit ekilen makrofaj farklılaştırma kültürünün ışık mikroskobu görüntüsü. Beyaz oklar, monosit-makrofaj ara formunu göstermektedir. (C) 10X ve (D) 20X magnifikasyonda kaydedilen, monosite dönüşüm profili gözlenen ileri gün makrofaj kültürlerinde ışık mikroskobu görüntüsü. Ölçek çubuğu: 25 µm.

Sağlıklı birey kökenli makrofaj kültürlerindeki hücre morfolojileri aynı zamanda taramalı elektron mikroskopi (SEM) tekniği ile incelendi ve kültürlerde ışık

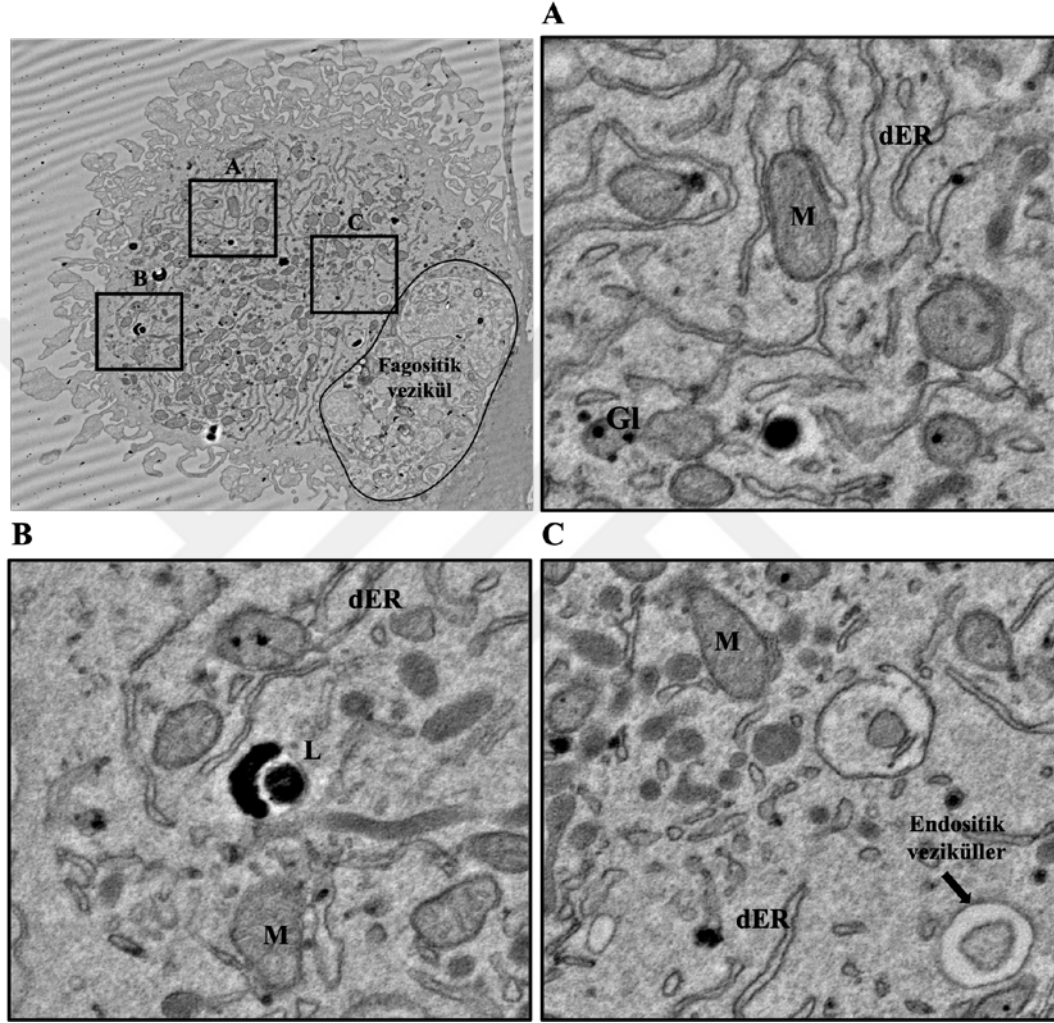
mikroskobu gözlemleri ile uyumlu olarak yuvarlak şekilli (Şekil 6.36 A) ve ince uzun şekilli (Şekil 6.36 B) hücre morfolojileri tespit edildi.



Şekil 6.36 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile makrofaj morfolojilerinin incelenmesi. (A) Yuvarlak (Ölçek çubuğu: 5 μm , büyütme 6,5X oranındadır) ve (B) uzantısal (Ölçek çubuğu: 10 μm , Şekil sırasıyla %150 ve 3X oranında büyütülmüştür) şekilli makrofajların taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.

Makrofajların hücre içi organel yapıları, yoğunluğu ve hücreler arası bağlantılarını incelemek amacıyla, makrofaj kültüründe aktarımlı elektron mikroskobu (TEM: Transmission electron microscopy) analizi gerçekleştirildi. Düz endoplazmik retikulum (ER), mitokondri ve glikojen yapıları makrofaj hücre içerisinde yoğunlukla gözlemlendi (Şekil 6.37 A). Makrofaj hücrelerinde en fazla bulunan lizozom organelinin bizim kesitimizde az sayıda gözlenmesi, TEM protokolünün uygulandığı hücre kesiti

düzleminde az sayıda olmasıyla veya hücre fikslemediği zaman fagositik bir aktivitesinin olmamasına bağlı olarak açıklanabilir (Şekil 6.37 B). Bununla birlikte, makrofaj hücresinde, içerisinde sindirilecek organel parçacıkları olduğu tahmin edilen endositik veziküller de gözlemlendi (Şekil 6.37 C).

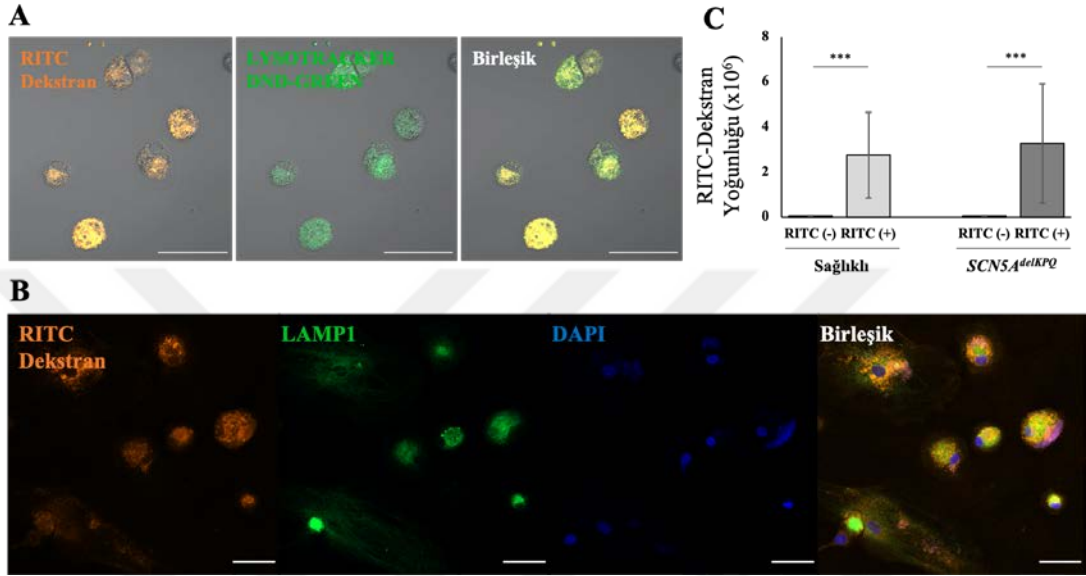


Şekil 6.37 Geçirimli elektron mikroskopi (TEM) analizi ile sağlıklı makrofaj hücre içi organellerin incelenmesi. dER: Düz endoplazmik retikulum. Gl: Glikojen. M: Mitokondri. L: Lizozom.

6.2.11 Makrofaj kültürlerinde fagositoz analizi

Literatürde makrofaj kültürlerinin en tipik karakterizasyon yöntemi fagositoz aktivite analizidir. Makrofaj kültürlerinde farklılaşma süreci tamamen sonlandığında ve kültürde olgun morfolojiler tespit edildikten sonra, hücrelerin fagositoz özelliğini tespit etmeye yönelik kültür besiyerine 18 saat süreyle RITC-dekstran eklendi.

Kültürler sonraki gün konfokal floresan mikroskobu tekniği ile incelendiğinde makrofajların dekstran moleküllerini fagosite ettiği gözlemlendi (Şekil 6.38 A). Makrofajların lizozom içeriklerinin yüksek olması sebebiyle fagosite ettiği dekstran moleküllerinin lizozomik yapılarda olması beklenir.

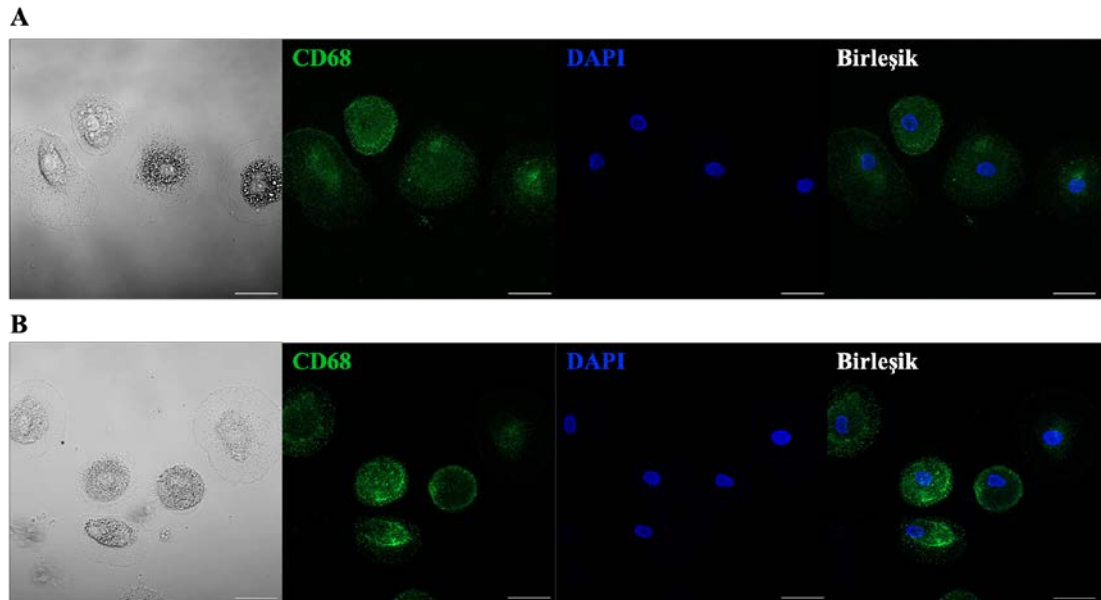


Şekil 6.38 Makrofaj kültürlerinde fagositoz analizi. (A) Canlı makrofaj kültürü 8. günde RITC-dekstran, Lysotracker-DND Green boyaması ve örtüşme görüntüleri. (B) Canlı fagositoz deneyi yapılmış ve tespit edilmiş kültürde LAMP-1 antikoru immünboyaması konfokal floresan görüntüleri. (C) Canlı kültürlerdeki RITC-dekstran uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerin 546 nm dalga boyunda yoğunluklarının karşılaştırmalı grafiği. N=3. Ölçek çubuğu: 50 μ m. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiştir. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Bunun kontrolü için Lysotracker boyama sonrası kültürler konfokal floresan mikroskobunda incelendiğinde, RITC ve Lysotracker için ayarlanan lazer kanallarında çakışma gözlemlendi ve böylece fagosite edilen moleküllerin lizozomda olduğu doğrulandı (Şekil 6.38 A). RITC-dekstran molekülü hücre içi lizozomlarda fikslenme sonrası da tespit edildi (Şekil Şekil 6.38 B). RITC-dekstran moleküllerinin immünreaktiviteyi sağlıklı ve hasta grubu makrofajlarda kantitatif olarak karşılaştırıldığında, iki grup arasında anlamlı fark gözlenmedi ($P = 0,8340$, Şekil 6.38 C). Fagositoz sonucu RITC⁺ makrofajlardaki immünreaktivite, RITC-dekstran içermeyen kontrol grubu makrofajlardan anlamlı olarak yüksekti ($P = 0,0001$, Şekil 6.38 C).

6.2.12 Makrofaj kültürlerinde Fc reseptör bloklama

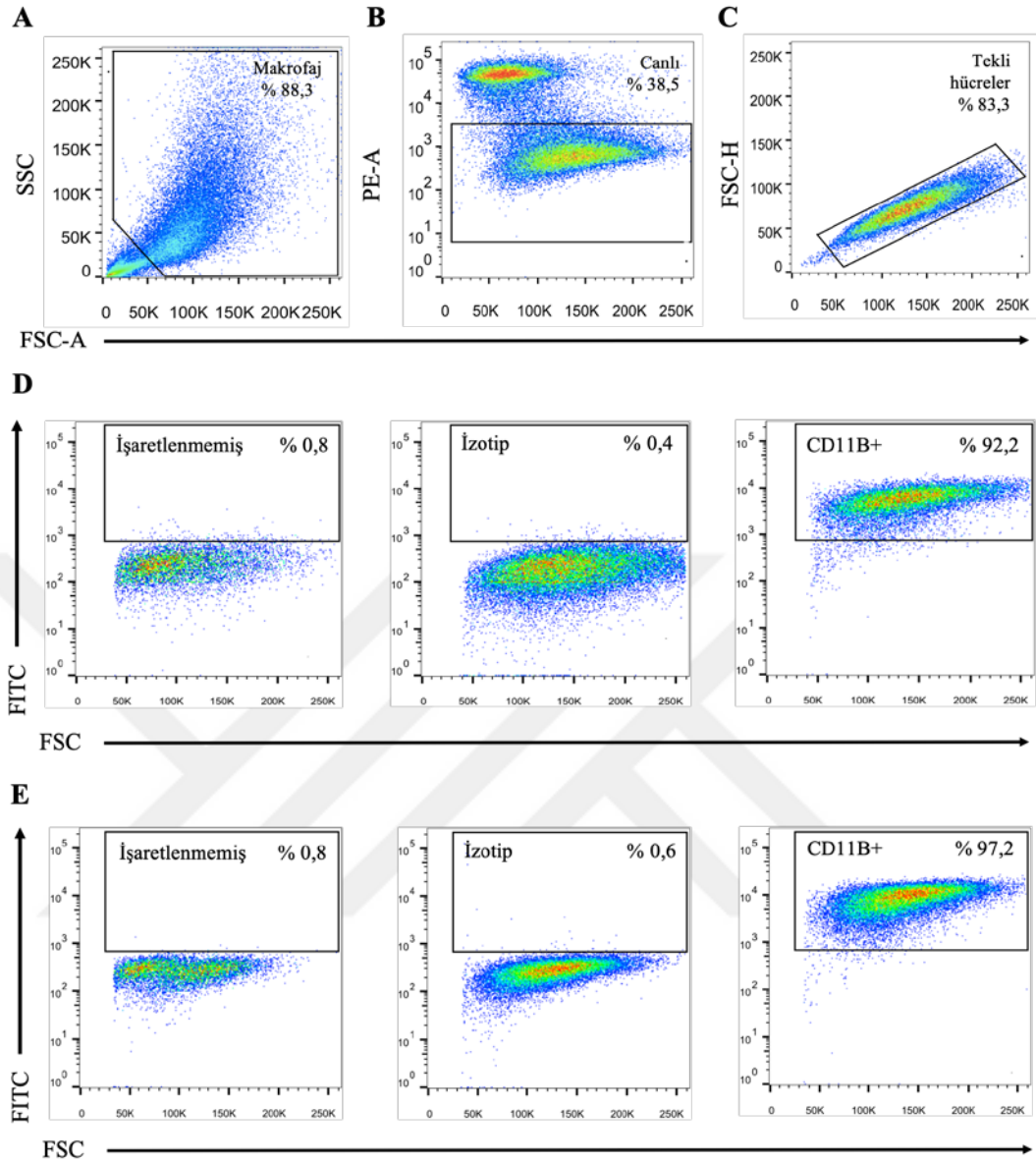
İntegrin-ilışkili reseptör ailesine ait Fc gama reseptör proteinleri immün sistem hücrelerinin membranlarında yüksek miktarda bulunur (99, 100). Fc reseptörleri, enfekte hücelere veya patojenlere bağlı antikorlara bağlanır. Bu sayede, fagositik veya sitotoksik hücreleri, antikor aracılı fagositoz veya antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksiste yoluyla enfekte olmuş hücreleri yok etmek için uyarır. Bu tez çalışmasında kullanılacak primer ve sekonder antikorların, makrofaj membranlarındaki Fc reseptörlerine non-spesifik şekilde bağlanacağı öngörülerek, Fc reseptör bloklayıcı solüsyon temin edildi. Bu bloklama işleminden önce tüm makrofajlarda CD68 immünboyaması sonucu CD68 proteini makrofaj hücresi içerisinde tüm lokasyonlarda pozitif ve soluk şekilde gözlemlendi (Şekil 6.39 A). Fc reseptör bloklama işleminden sonra immünboyaması yapılan makrofajlarda non-spesifik bağlanmalar dolayısıyla yalancı pozitif sonuç büyük ölçüde önlenmiş oldu ve bunun sonucunda doğru CD68 antikor bağlanmaları ile spesifik bir işaretleme sağlandı. CD68 boyaması Fc reseptör bloklama ile hücre içerisinde spesifik lokasyonlarda ve yoğunlukta gözlemlendi (Şekil 6.39 B).



Şekil 6.39 Makrofaj kültürlerinde Fc reseptör bloklama optimizasyonlu immünboyama görüntüleri. Fc reseptör bloklama (A) öncesi ve (B) sonrası anti-CD68 antikoruna ile immünboyamaları yapılan sağlıklı monosit kökenli makrofaj kültürlerinden alınmış representatif konfokal floresan mikroskopi görüntüleri. Ölçek çubuğu: 50 μ m.

6.2.13 Makrofaj kültürlerinde akım sitometrisi analizi

Makrofaj farklılaşma verimini kantitatif olarak belirlemek amacıyla, sağlıklı ve *SCN5A^{delKPQ/+}* mutasyonu taşıyan konjenital aritmi hastalarına ait makrofaj kültürlerinde akım sitometrisi analizi gerçekleştirildi. Hücreler bulundukları kaptan kaldırılarak canlı halde buz üzerinde anti-CD11B-FITC antikoru ile işaretlendi. Tüm hücrelere analizden hemen önce canlılık boyası propidyum iyodin (PI) eklendi. Analiz için Şekil 6.40 A’da gösterilen debri dışında seçilen tüm hücre popülasyonuna, canlılık (Şekil 6.40 B) ve tek hücrelerin seçimini (Şekil 6.40 C) içeren kapılama (gating) stratejisi uygulandı. Akım sitometrisi analizi esnasında, işaretlenmemiş hücrelerin (unstained) ve spesifik olmayan bağlanmayı gösteren izotip antikor grubunun FITC kanalı ışınması, %1’in altında olacak şekilde ayarlandı. Akım sitometrisi analizi sonucunda, sağlıklı makrofaj kültürlerinin yaklaşık $92,2 \pm 3,4$ CD11B⁺ hücre (Şekil 6.40 D) ve hasta kaynaklı makrofaj kültürlerinin yaklaşık $97,2 \pm 4,2$ CD11B⁺ hücre (Şekil 6.40 E) içerdiği tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmadı ($P=0,11185$). Bu analiz, makrofaj kültürlerinin yüksek oranda miyeloid kökenli CD11B⁺ makrofaj içerdiğini göstererek farklılaşma kültürümüzün verimliliğini doğrulamıştır.



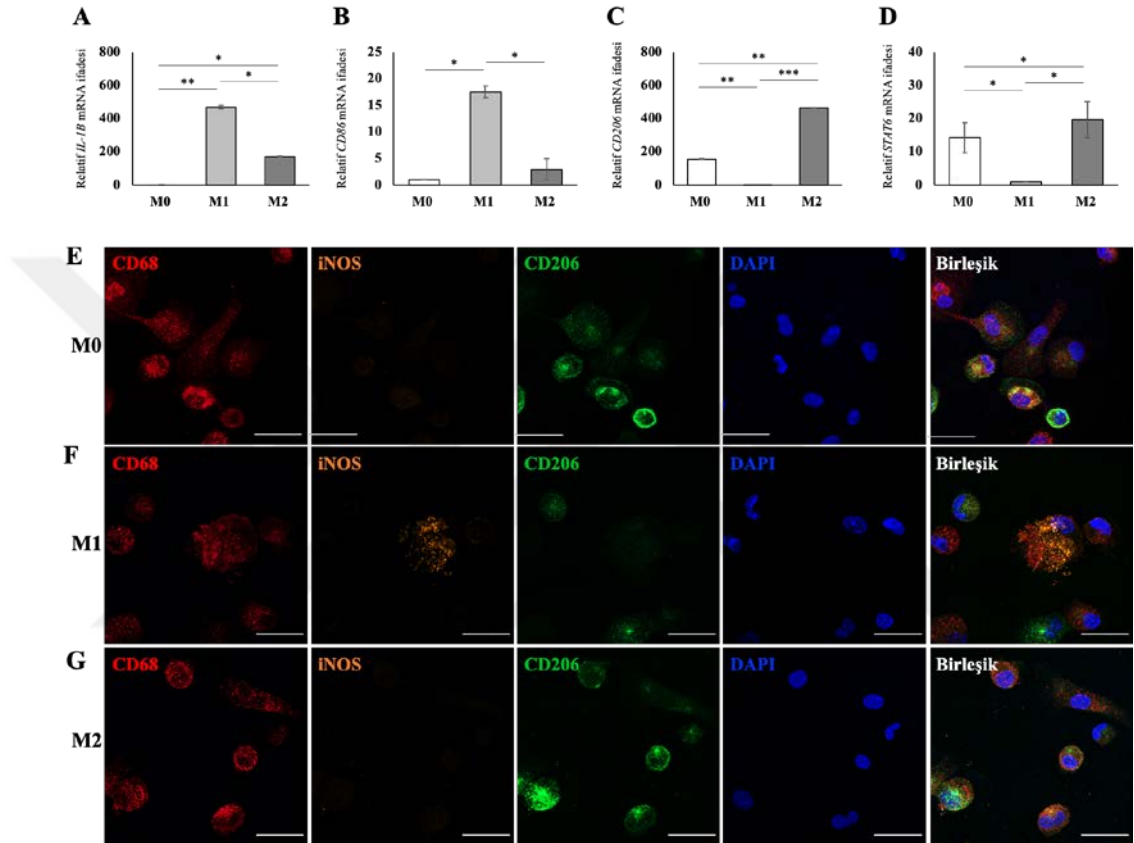
Şekil 6.40 Sağlıklı ve konjenital aritmi hasta kökenli makrofaj kültürlerinde akım sitometrisi analizi. Makrofaj akım sitometrisi analizinde (A) tüm makrofajları, (B) PI canlılık boyası ile işaretlenen canlı hücre popülasyonunu ve (C) Canlı hücre popülasyonu içerisinde tespit edilen tekli hücreleri gösteren kapılama stratejisi. (D) Sağlıklı kültürlerden ve (E) Hasta kökenli kültürlerden işaretlenmemiş (Unstained), izotiple işaretlenmiş (Isotype) ve CD11B-FITC antikorı ile işaretlenmiş popülasyonların (Stained) kapılandıktan sonra belirlenen CD11B⁺ hücrelerin yüzdelerini gösteren akım sitometri analizi. N=3. SSC: Yan saçılım. FSC: İleri saçılım. PE-A: Fikoeritrin-Alan (Area). FSC-A: İleri saçılım-Alan. FSC-H: İleri saçılım-Yükseklik (Height). FITC: Floresan izotiyosiyanat. PI: Propidyum iyodin.

6.2.14 Makrofaj kültürlerinde M1/M2 fenotipi polarizasyonu ve karakterizasyonu

Sağlıklı ve hasta kökenli makrofaj kültürlerinin moleküler karakterizasyonundan önce, makrofajlar M1 ve M2 polarizasyonlarına yönlendirilerek immünboyama ve kantitatif RT-PZR deneylerinde kullanılacak bazı gen primeri ve antikör denemeleri ve optimizasyonları yapıldı. Bunun için, monosit kökenli sağlıklı bireye ait naiv M0 makrofaj kültürleri, LPS ve IFN- γ rekombinant proteinlerin varlığında M1 polariteli makrofajlara, IL-4 varlığında ise M2 polariteli makrofajlara dönüştürüldü. M1 fenotipinin literatürde en sık kullanılan belirteçleri *IL-1B* ve *CD86* genleri, M2 fenotipinin en sık kullanılan belirteçleri *CD206* ve *STAT6* genleri ifadeleri kantitatif RT-PZR ile incelendi (Şekil 6.41 A-D). M1 polariteli makrofajlarda, *IL-1B* ($P=0,0038$, $P=0,0157$) ve *CD86* ($P=0,0262$, $P=0,0299$) gen ifadeleri, sırasıyla M0 ve M2 makrofajlara oranla anlamlı şekilde yüksek bulundu (Şekil 6.41 A, B). İlginç olarak *IL-1B* gen ifadesinin M2 polariteli makrofajlarda, naiv M0 makrofajlara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi ($P=0,0110$, Şekil 6.41 A). *CD86* gen ifadesi açısından M0 ve M2 makrofajları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($P=0,4092$, Şekil 6.41 B). M2 polariteli makrofajlarda ise *CD206* gen ifadesi, M0 ($P=0,0021$) ve M1 ($P=0,0001$) makrofajlara oranla anlamlı şekilde yüksekti (Şekil 6.41 C). *CD206* ile benzer patern gösteren *STAT6* gen ifadelerinin de aynı şekilde M0 ($P=0,0372$) ve M1 ($P=0,0157$) makrofajlara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu tespit edildi (Şekil 6.41 D). M0 makrofajlarda *CD206* ve *STAT6* gen ifadeleri ise, M1 makrofajlara oranla istatistiksel açıdan anlamlı şekilde yüksek olarak belirlendi ($P=0,0037$, $P=0,0357$, Şekil 6.41 C, D).

Polarize edilen makrofajlarda M1 ve M2 makrofaj fenotipi spesifik belirteçlere özgü immünboyamalar gerçekleştirildi. Bu deneylerde, literatürde sıklıkla kullanılan M1 fenotipi spesifik iNOS, M2 fenotipi spesifik CD206 (MRC1: mannoz reseptörü) ve genel makrofaj belirteci CD68 proteinlerini işaretleyen antikörlardan faydalanıldı (Şekil 6.41 E-G). Tüm kültür gruplarında makrofajların CD68 proteinini yüksek oranda ifade ettiği belirlendi (Şekil 6.41 E-G). M0 ve M2 polariteli makrofajlar M2 spesifik CD206 proteini bakımından pozitif izlenirken bu iki grupta hiçbir hücrede iNOS proteini tespit edilmedi (Şekil 6.41 E, G). M1 makrofaj kültürlerinde ise hücrelerin intraselüler bölgelerinde iNOS proteini yüksek oranla pozitif belirlendi

(Şekil 6.41 F). M2 ve M0 makrofaj kültürlerinde mRNA ifade analizleri ve immünboyama sonuçlarındaki ortak benzerlikte olan literatür ile uyumlu bu sonuçlar bize M0 naiv makrofajların M1 fenotipinden uzak, M2 makrofajlara yakın gen ifade paterni sergilediğini gösterdi (144, 218, 219).



Şekil 6.41 Polarize edilen makrofajlarda kantitatif RT-PZR ve immünboyamalar. M0 naiv, M1 ve M2 polariteli makrofajların (A) *IL-1β* (B) *CD86* (C) *CD206* (D) *STAT6* gen ifadelerini gösteren grafikler. 8. gün sağlıklı (E) M0 naiv, (F) M1 ve (G) M2 polariteli makrofajların immünohistokimyasal boyama görüntüleri. iNOS: indüklenmiş nitrik oksit sentaz, CD206: mannoz reseptörü. DAPI: Çekirdek boyası. Ölçek çubuğu: 50 µm. Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

6.2.15 Sağlıklı ve hasta kökenli makrofaj kültürlerinde moleküler karakterizasyonlar

Monosit kökenli makrofaj kültürlerinde 12. günde makrofaj belirteç genlerinin ekspresyon seviyeleri kantitatif RT-PZR yöntemiyle (Şekil 6.42) ve protein ifadeleri

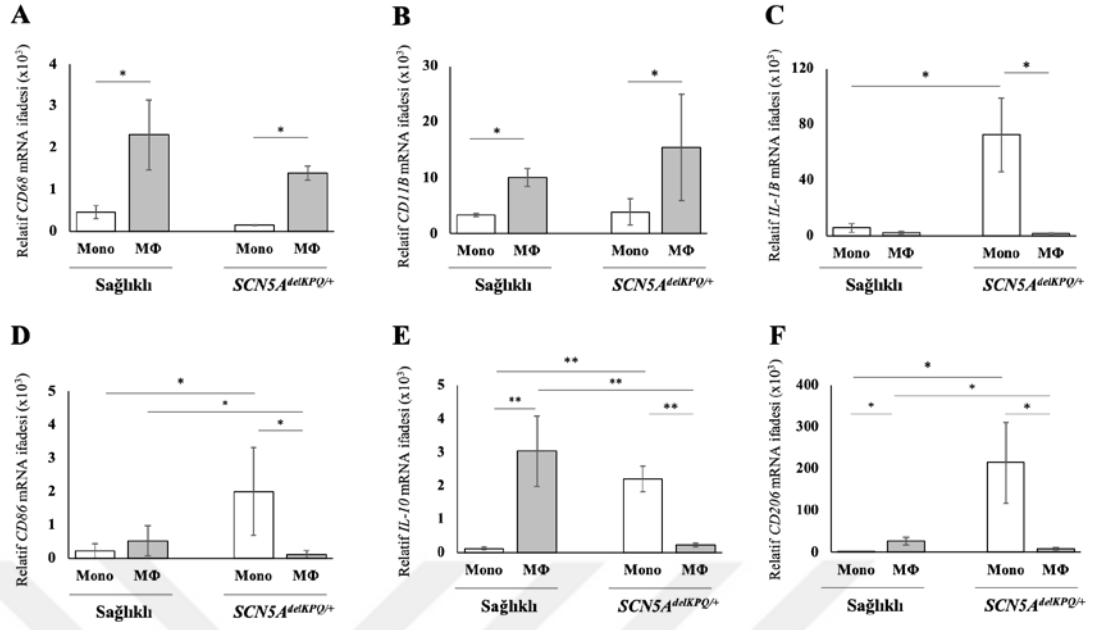
immünohistokimyasal boyamalarla incelendi (Şekil 6.43). CD14⁺ monositlerde ve bu monositlerden farklılaştırılmış sağlıklı ve *SCN5A*^{delKPQ/+} mutasyonlu hasta grubu makrofajlarda incelenen makrofaj spesifik genlerin ifadeleri, negatif kontrol amaçlı kullanılan ve bu genleri ifade etmesi beklenmeyen CD14⁻ hücrelere göre normalize edildi. Literatürde makrofaj kültürleri için en sık kullanılan gen primerleri temin edilerek hepsi en az ikişer kez THP-1 hücre hattı veya CD14⁺ monosit kökenli makrofaj kültürlerinden izole edilen RNA örnekleri kullanılarak çalışıldı. Tablo 5.14'teki primerler ile sonuç elde edilirken, M1 fenotipi için *IL12B*, *CXCL10*, *HLA-DRB1*, *iNOS* primerleri, M2 fenotipi için *ARG1*, *CD163*, *CCL17* primerleri ve dendritik hücre için analize alınan *CD209* ve *CD1D* gen primerleri ile gerçekleştirilen kantitatif RT-PZR sonuçlarında sağlıklı ve hasta grubu makrofaj kültürlerinde herhangi bir amplifikasyon görülmedi.

Kantitatif RT-PCR sonuçlarımıza göre, genel makrofaj belirteci kabul edilen *CD68* geninin ifadesi, sağlıklı ($P=0,0201$) ve *SCN5A*^{delKPQ/+} mutasyonlu hasta kökenli ($P=0,0174$) makrofajlarda, CD14⁺ hücrelere göre oranla istatistiksel açıdan anlamlı şekilde yüksek olarak tespit edildi (Şekil 6.42 A). Sağlıklı ve hasta kökenli monosit ve makrofajlar arasında ise *CD68* mRNA ifadesi açısından anlamlı bir fark tespit edilmedi (sırasıyla $P=0,0549$, $P=0,1269$, Şekil 6.42 A). Bir diğer genel makrofaj belirteci olarak kabul edilen *CD11B* gen ifadesinin, sağlıklı ($P=0,0117$) ve *SCN5A*^{delKPQ/+} mutasyonlu hasta kökenli ($P=0,0256$) makrofajlarda CD14⁺ hücrelere göre oranla istatistiksel açıdan anlamlı şekilde yüksek olduğu analiz edildi (Şekil 6.42 B). Sağlıklı ve hasta kökenli monosit ve makrofajlar arasında ise *CD68* mRNA ifadesi açısından anlamlı bir fark tespit edilmedi (sırasıyla $P=0,1787$, $P=0,2645$, Şekil 6.42 B). *CD68* ve *CD11B* mRNA ifadeleri monosit ve makrofajlarda M0 naiv makrofaj fenotipinin incelenmesi için analiz edilmiştir ve bu genlerin ifadeleri beklenildiği üzere anlamlı şekilde artmıştır. Bu sonuç bize başarılı bir şekilde makrofaj kültürleri elde ettiğimizi moleküler açıdan göstermiştir. Bununla birlikte makrofajlarda *CD11B* gen ifadesinin istatistiksel anlamlı olarak artmış seviyeleri, akım sitometrisi analizi ile daha önce teyit ettiğimiz *CD11B* protein pozitifliği ile paralellik sağlamaktadır (Şekil 6.40).

M1 makrofaj fenotipinin en sık kullanılan belirteçlerinden *IL-1B* geni artmış ifadeleri değerlendirildiğinde, hasta kökenli monosit hücrelerinde sağlıklı monositlere

ve hasta makrofajlara oranla istatistiksel açıdan anlamlı şekilde tespit edildi (sırasıyla $P=0,0144$, $P=0,0127$, Şekil 6.42 C). Sağlıklı monosit ve makrofajlar arasında ($P=0,0819$) ve sağlıklı ve hasta makrofajlar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($P=0,1862$, Şekil 6.42 C). Diğer bir M1 makrofaj belirteci *CD86* gen ifade seviyeleri, hasta kökenli monosit hücrelerinde sağlıklı monositlere ve hasta makrofajlarına oranla istatistiksel açıdan anlamlı şekilde arttı (sırasıyla $P=0,0208$, $P=0,0167$, Şekil 6.42 D). Sağlıklı monosit ve makrofajlar arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken ($P=0,0753$), kontrol makrofajlarda hasta kökenli makrofajlara oranla *CD86* gen ifadesi yüksek bulundu $P=0,0177$, Şekil 6.42 D).

M2 makrofaj fenotipinin genel bir belirteci olan *IL-10* geninin ifadesi ise, sağlıklı ve hasta kökenli makrofajlarda, sağlıklı ($P=0,0034$) ve hasta kökenli monositlere oranla ($P=0,0017$) istatistiksel açıdan anlamlı şekilde arttığı belirlendi (Şekil 6.42 E). Sağlıklı ve hasta kökenli monositler ve makrofajlar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, *IL-10* geninin ifadesi sağlıklı monositlerde hasta monositlere oranla azaldığı ($P=0,0015$), sağlıklı makrofajlarda hasta makrofajlara oranla arttığı tespit edildi ($P=0,0038$, Şekil 6.42 E). M2 makrofaj fenotipi spesifik diğer bir belirteç olan mannoz reseptör proteinini kodlayan *CD206* geninin ifadesi, sağlıklı makrofaj kültürlerinde köken aldığı monositlere oranla istatistiksel açıdan anlamlı artış gösterdi ($P=0,0116$, Şekil 6.42 F). Ters olarak, hasta kökenli makrofaj kültürlerinde hasta monositlerine oranla anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi ($P=0,0236$, Şekil 6.42 F). Sağlıklı ve hasta kökenli monositler ve makrofajlar kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, *CD206* geninin ifadesi sağlıklı monositlerde hasta monositlere oranla azaldığı ($P=0,0214$), sağlıklı makrofajlarda hasta makrofajlara oranla arttığı tespit edildi ($P=0,025572$, Şekil 6.42 F).

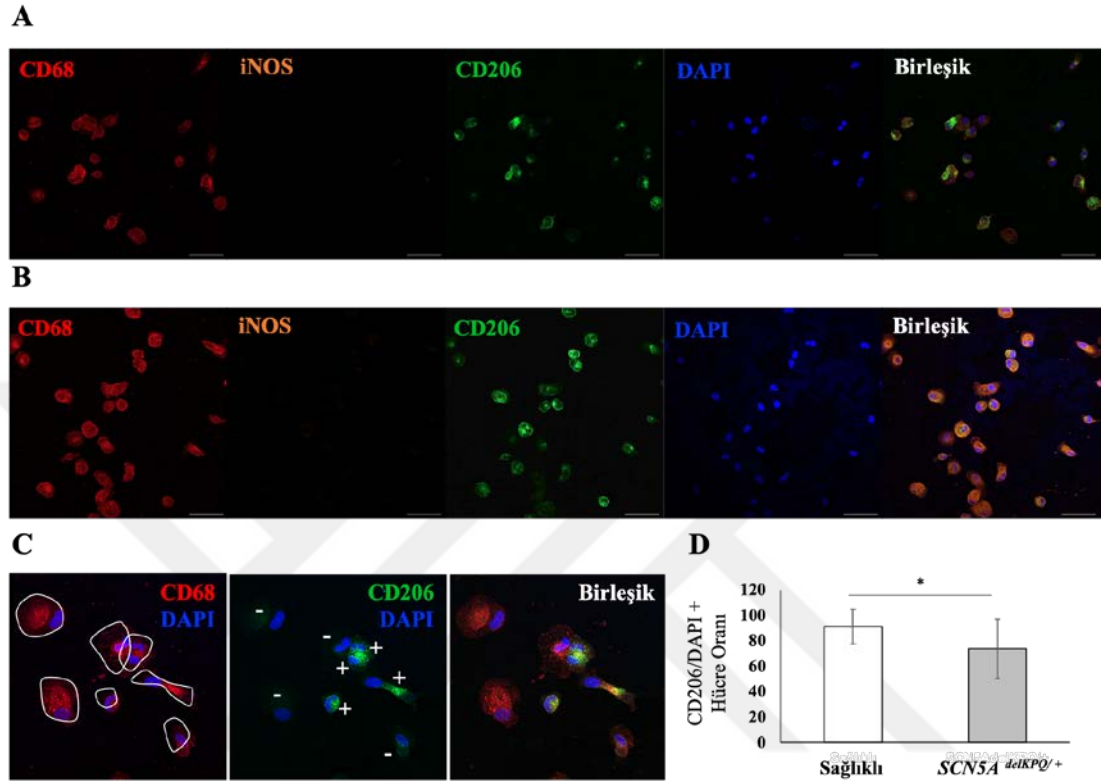


Şekil 6.42 Sağlıklı ve konjenital aritmi hasta kökenli makrofajlarda mRNA ifadelerinin analizi. 12. gün sağlıklı ve *SCN5A^{delKPQ/+}* makrofajlarda monositlere oranla (A) *CD68*, (B) *CD11B*, (C) *IL-1B*, (D) *CD86*, (E) *IL-10*, (F) *CD206* gen ifadelerini gösteren grafikler. MΦ: Makrofaj. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiştir. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$.

Sağlıklı birey (Şekil 6.43 A), *SCN5A^{delKPQ/+}* (Şekil 6.43 B) mutasyonu taşıyan konjenital aritmi hastaları kökenli makrofaj kültürlerinin immünboyamalarında, makrofaj polarizasyon deneyinde sonuç aldığımız antikorlar kullanıldı. CD68 proteini antikor boyamaları tüm gruplarda hücre içerisinde homojen bir şekilde gözlemlendi (Şekil 6.43 A, B). Sağlıklı ve hasta kaynaklı hiçbir makrofaj kültüründe M1 belirteci iNOS boyanmış pozitif hücre tespit edilmedi, fakat tüm kültürlerde M2 belirteci olan CD206 proteini işaretlenmiş hücreler yoğunlukla tespit edildi (Şekil 6.43 A, B). Sağlıklı ve hasta grupları arasında hücre morfolojisi ve antikor boyanması açısından bir fark gözlemlenmedi.

Sağlıklı ve hasta grubu arasında CD206 proteini yoğunluğu açısından karşılaştırıldığında, makrofaj hücreleri içerisindeki CD206 antikorunun immünreaktivite gösterdiği hücreler pozitif, diğer hücreler negatif kabul edildi (Şekil 6.43 C) ve hücreler DAPI⁺ çekirdek sayısına göre oranlandı (Şekil 6.43 D). Sonuç olarak yoğunluk analizi yapıldığında sağlıklı makrofajlarda CD206 pozitif hücre oranı $91,38 \pm 13,71$ iken, *SCN5A^{delKPQ/+}* mutasyonu taşıyan hasta kökenli makrofajlarda

bu oran $73,76 \pm 23,38$ olarak tespit edildi ve sağlıklı gruba oranla CD206 pozitif hücre oranı anlamlı olarak azaldığı hesaplandı ($P < 0,001$, Şekil 6.43 D).



Şekil 6.43 Sağlıklı ve konjenital aritmi hasta kökenli makrofajlarda immünboyamalar. (A) Sağlıklı bireyden ve (B) *SCN5A*^{delKQP/+} mutasyonlu UQTS-3 hastası bireyden elde edilmiş makrofaj kültürlerinde anti-CD68, anti-iNOS, anti-CD206 ile gerçekleştirilen immünboyamaların konfokal floresan mikroskop görüntüleri. (C) CD206⁺/DAPI⁺ hücre seçim stratejisi. (D) Sağlıklı ve *SCN5A*^{delKQP/+} makrofajlarda CD206⁺ hücre oranını gösteren grafik. N=2. DAPI: Çekirdek boyası. Ölçek çubuğu: 50 μ m. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

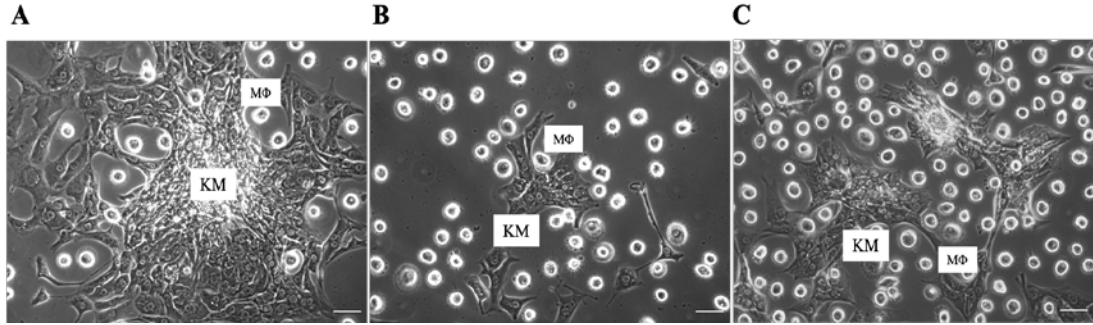
Kolektif olarak bu sonuçlar değerlendirildiğinde, sağlıklı veya hasta kaynaklı monosit ve makrofaj kültürlerinde yapılan gen ifade analizlerinde büyük ölçüde benzer bir artma ve azalma eğilimi tespit edilmiştir. Diğer bir deyişle, bu sonuçlar bize farklılaştırdığımız makrofajların genetik kökeninden bağımsız olarak ve spesifik bir uyaran olmadan, M1 fenotipinden uzak fakat M2 fenotipine yakın bir profil sergilediklerini göstermiştir. Bu sonuçlar literatür bulguları ile uyumludur (144, 218, 219).

Sağlıklı ve hasta kökenli makrofaj kültürlerinin M1 / M2 fenotip eğilimini belirlemek amacıyla immünboyamalarda kullanmak üzere, M1 fenotipi için anti-CXCL10 ve anti-iNOS antikorları, M2 fenotipi için ise anti-CD163 antikorları temin edildi. Literatürde sıklıkla tercih edilen bu antikorlar ile sağlıklı ve hasta kökenli makrofaj kültürlerinin hiçbirinde pozitif bir boyanma paterni gözlemlenemedi. Buna ek olarak, söz konusu belirteçlerin kantitatif RT-PZR yöntem ile mRNA ifadelerini incelediğimizde karşılaştığımız negatif sonuç, bize kültürlerimizde M1 polarizasyonunda makrofajların bulunmadığını düşündürdü. Makrofaj kültürlerinin dendritik hücre içermediği göstermek amacıyla temin ettiğimiz dendritik hücre belirteci olan DC-SIGN1 (dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin 1) proteinini işaretleyen anti-CD209 antikor boyaması da kültürlerde negatif şekilde gözlemlendi.

6.2.16 Kokültürlerde hücre oranı ve süre optimizasyonu

Tekli kültürlerinin karakterizasyonundan sonra yürütülen kokültür koşullarının optimizasyon çalışmalarında, sağlıklı hücreler kullanıldı ve kokültür besiyeri olarak, kardiyomiyosit ve makrofaj besiyerleri 1:1 oranında taze karıştırılarak kullanıldı (220). Kardiyomiyosit-makrofaj hücre oranlarının kokültürlerde birleştirme oranları hakkında daha önce literatürde tanımlanmış bir metot olmadığı için öncelikle hücre ekim oranı optimizasyon deneylerini gerçekleştirdik. Dereceli olarak azaltarak 1:3 (Şekil 6.44 A), 1:5 (Şekil 6.44 B) ve 1:7 (Şekil 6.44 C) şeklinde birleştirdiğimiz Kardiyomiyosit : Makrofaj hücreleri ile sağlıklı kokültür oluşturduk. Bu konsantrasyonları denememizin sebebi, projemizin hipotezini oluşturmamızda faydalandığımız Hulsmans ve ekibinin çalışmasının fare yetişkin kardiyomiyosit ve makrofaj hücrelerini 1:7 oranında birleştirmiş olmasıydı (9). Oluşturduğumuz değişik oranlı kokültürleri, gün gün ışık mikroskopunda gözlemleyerek hücrelerin fiziksel etkileşimlerini takip ettik (Şekil 6.44). En verimli kokültür hücre oranı sayısı, 2 hafta sonunda makrofaj hücrelerinin en az oranla ekildiği 1:3 grubu olarak belirlendi ve deneylere bu oranla devam edildi. Diğer gruptaki makrofaj hücrelerinin yoğunluğunun, kültürlerdeki kardiyomiyositlerin kültür kaplarına yapışma verimini ve kasılmalarını negatif yönde etkilediği gözlemlendi. Analizlere dahil edilen kokültürlerdeki

kardiyomiyositler rutin ve senkronize atım profilleri sergilemekteydi. Makrofaj hücrelerinin ise kardiyak hücre kümeleri ve tekli kardiyomiyositler ile fiziksel bağlantı kuran bölgeleri analizler için seçildi.



Şekil 6.44 Kokültürlerde makrofaj ve kardiyomiyosit hücre oranları optimizasyonu. Kardiyomiyosit:Makrofaj olacak şekilde birleştirdiğimiz (A) 1:3, (B) 1:5, (C) 1:7 oranına sahip sağlıklı kokültür ışık mikroskopi görüntüleri. N=2. MΦ: Makrofaj. KM: Kardiyomiyosit. Ölçek çubuğu: 50 μ m.

Diğer optimizasyon çalışmamız ise kokültürlerin kaç gün süreyle verimli bir şekilde deneylerimizde kullanabileceğimiz üzerineydi. Yine literatür bilgisi ve kendi deneyimlerimiz doğrultusunda, makrofaj hücrelerinin 20 günü aşkın süre sonrası monositlere dediferansiyasyon göstermesi sebebiyle, kokültürleri literatür ile uyumlu olarak en fazla 14 gün süre ile devam ettirdik (169, 221). Hücreler arası bağlantıların oluşup kardiyomiyosit kasılmalarının stabil ve spontan hale erişmesini sağlamak amacıyla, kokültürlerin oluşturulmasından minimum 7. gününden sonra kültürlerde analizlere başlandı.

6.2.17 Sağlıklı ve hasta kökenli kokültür gruplarının oluşturulması ve hücreler arası bağlantıların morfolojik olarak incelenmesi

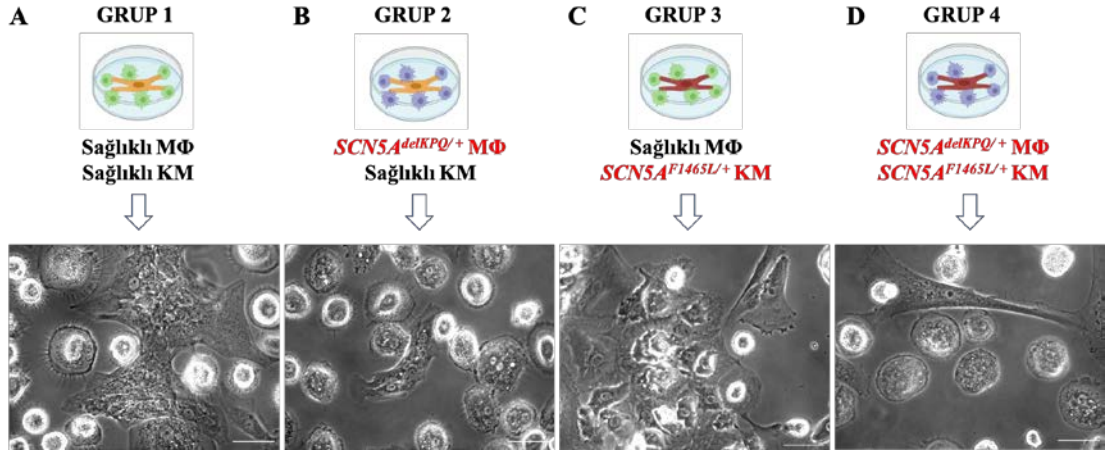
Sağlıklı ve hasta kökenli kardiyomiyosit ve makrofajların tekli kültürlerinin karakterizasyonları sonucu beklenen morfoloji ve moleküler yapıyı sergiledikleri teyit edildikten sonra, bu iki hücre tipini direkt olarak aynı kaba ekip bir araya getirerek *in vitro* kokültürler oluşturuldu. Makrofaj hücrelerinin bulundukları kaba sıkı bir şekilde

yapışık olma durumundan dolayı kardiyomiyositler uygun enzim varlığında uygun yeniden ekim prosedürüyle kaldırıp makrofaj kültürlerinin üzerine ekildi.

Kokültürlerde oluşturulan deneysel gruplar;

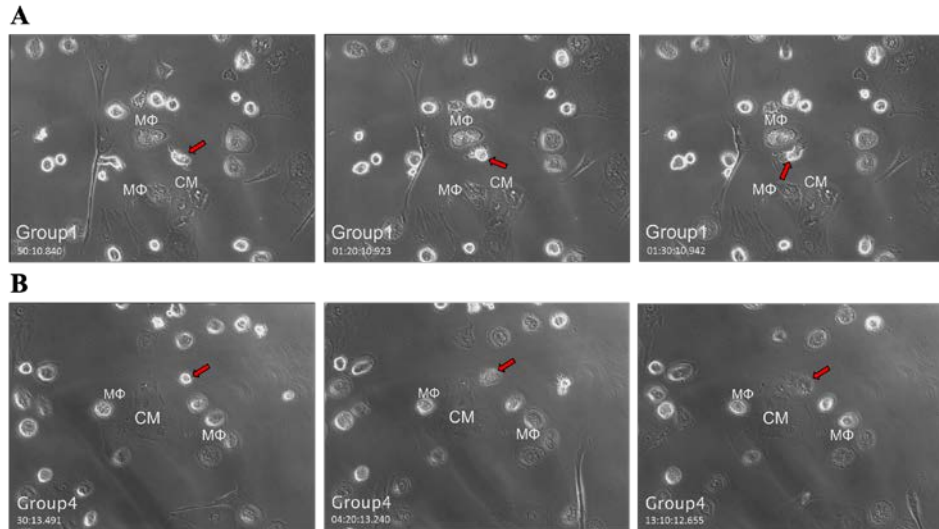
- **Kokültür grubu 1:** Sağlıklı bireylere ait kardiyomiyositler ile sağlıklı bireylere ait makrofaj kokültürleri,
- **Kokültür grubu 2:** Sağlıklı bireylere ait kardiyomiyositler ile $SCN5A^{delKPQ/+}$ mutasyonu taşıyan UQTS-3/Brugada sendromu hastalarına ait makrofaj kokültürleri,
- **Kokültür grubu 3:** $SCN5A^{F1465L/+}$ mutasyonu taşıyan ventriküler taşikardi hastası kökenli kardiyomiyositler ile sağlıklı bireylere ait makrofaj kokültürleri,
- **Kokültür grubu 4:** $SCN5A^{F1465L/+}$ mutasyonu taşıyan ventriküler taşikardi hastası kökenli kardiyomiyositler ile $SCN5A^{delKPQ/+}$ mutasyonu taşıyan UQTS3/Brugada sendromu hastalarına ait makrofaj kokültürlerini içermektedir.

Yukarıda bahsedilen optimizasyonlardan sonra, deneysel kokültür gruplarını oluşturduk. Kokültürlerin dizaynında sağlıklı birey ve konjenital aritmi hastalardan elde ettiğimiz uPKH kökenli kardiyomiyositler ve makrofajlar çeşitli kombinasyonlarda ekildi (Şekil 6.45 A-D). Makrofajlar, doğal immün sistem elemanı olmaları ve immün rejeksiyona yol açmamaları nedeniyle, farklı bireylerden elde ettiğimiz makrofaj ve kardiyomiyositleri kokültür gruplarımızda kullandık. Bu nedenle fonksiyonel olarak aynı etkiye sahip farklı $SCN5A$ mutasyonu taşıyan hücreler ile 4. grup hasta kokültürleri oluşturuldu (Şekil 6.45 D). Kokültür oluşturulmasından itibaren ilk üç gün içerisinde etkileşimler fiziksel olarak gözlemlendi fakat kardiyomiyositlerin fizyolojik olarak kasılmasının stabil hale gelmesi ve kokültürün olgunlaşması için tüm deneyler kokültürlerin 7-14. günleri arasında yürütüldü. Kokültürlerde ilk 7 gün boyunca ışık mikroskobu ile incelenen kültürlerin yoğun ve tekli hücreler içeren çeşitli bölgelerinden görüntüler kaydedildi (Şekil 6.45).

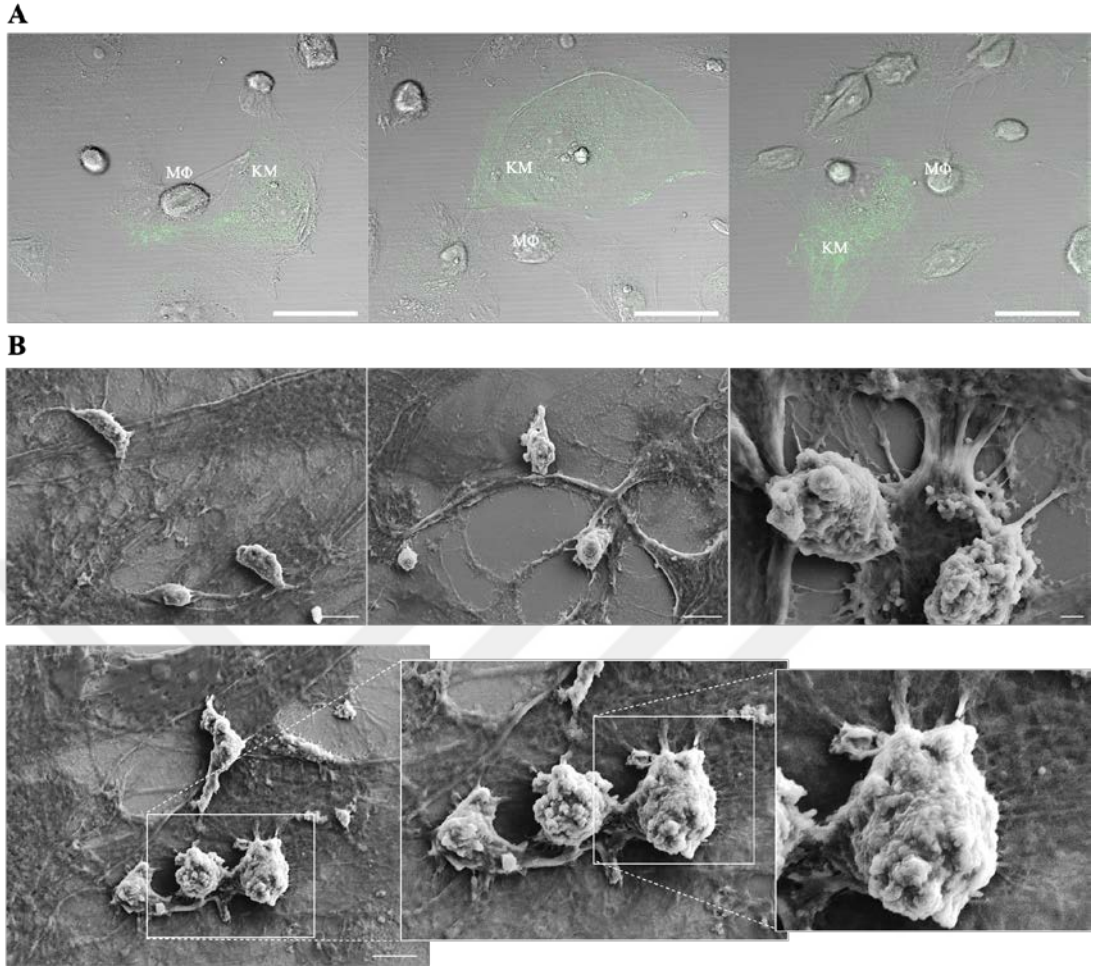


Şekil 6.45 Kokültürlerin oluşturulması ve ışık mikroskobu görüntüleri. (A) Grup 1, (B) Grup 2, (C) Grup 3 ve (D) Grup 4 kokültürlerinin hücre kombinasyonlarını gösteren şekiller ve membran temaslarına odaklanan ışık mikroskobu görüntüleri. N=3. MΦ: Makrofaj. KM: Kardiyomiyosit. Ölçek çubuğu: 50 µm.

Grup 1 (Şekil 6.46 A) ve Grup 4 (Şekil 6.46 B) kokültürlerde 24 saatlik hızlandırılmış (time-lapse) çekimler Spinning Disc konfokal mikroskobunda kaydedildi. Graplardan farklı zaman dilimlerinde çekilmiş görüntüler, kokültürlerde hareketli veya durgun şekildeki değişik morfolojili makrofajların (Şekil 6.46 kırmızı ok) kardiyomiyosit membranları ile fiziksel etkileşim kurduğunu göstermektedir.



Şekil 6.46 Kokültürlerde hızlandırılmış (time-lapse) çekimler. (A) Grup 1 ve (B) Grup 4 kokültürlerin hızlandırılmış çekimlerinden çeşitli zamanlardaki Spinning Disc konfokal mikroskobu görüntüleri. MΦ: Makrofaj. KM: UPKH-kökenli kardiyomiyosit.



Şekil 6.47 Sağlıklı kokültürlerde taramalı elektron mikroskopi görüntüleri. (A) Taramalı elektron mikroskopi görüntülenmesinden önce kardiyomiyositlerin anti-CTNT antikoru ile immünboyaması ardından aydınlık alan ve 488 nm dalga boyunda konfokal floresan mikroskopi görüntüleri. (B) Sağlıklı kokültürlerin çeşitli bölgelerinde kardiyomiyositler üzerine tutunarak fiziksel etkileşim kurmuş makrofajları içeren taramalı elektron mikroskopi görüntüleri. Ölçek çubuğu: 10 μ m.

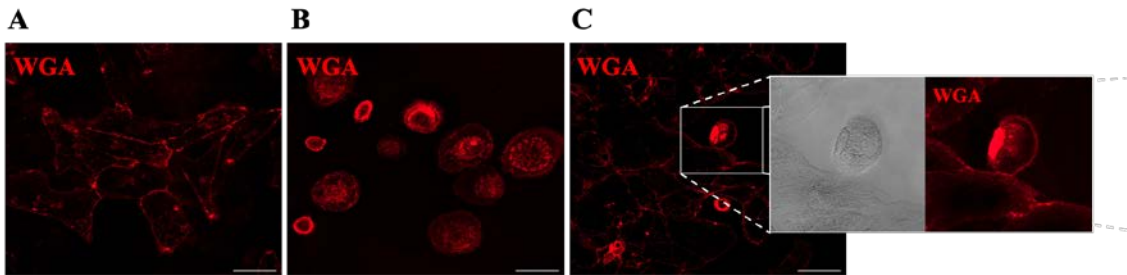
Tekli makrofaj kültürlerinin taramalı elektron mikroskopi görüntülenmesi ile makrofaj morfolojilerinin detaylı bir şekilde profili anlaşılmıştı. Kardiyomiyosit-makrofaj bağlantılarının detaylı morfolojik incelemek amacıyla sağlıklı kokültürlerde taramalı elektron mikroskopi yöntemi uygulandı. İşlemden önce kokültürlerdeki hücreleri ayırt edebilmek için kardiyomiyositleri canlı kültürlerde anti-CTNT antikoru ile immün olarak işaretledik ve konfokal floresan mikroskopi ile görüntüleyerek kokültürlerdeki kardiyomiyosit ve makrofaj bağlantılarının lokasyonlarını işaretledik (Şekil 6.47 A). Bu bölgelerdeki fiziksel bağlantılar taramalı elektron mikroskopi

çekimleri ile kaydedildi ve makrofajların membran uzantıları ile kardiyomiyositlere tutunduğu gözlemlendi (Şekil 6.47 B).

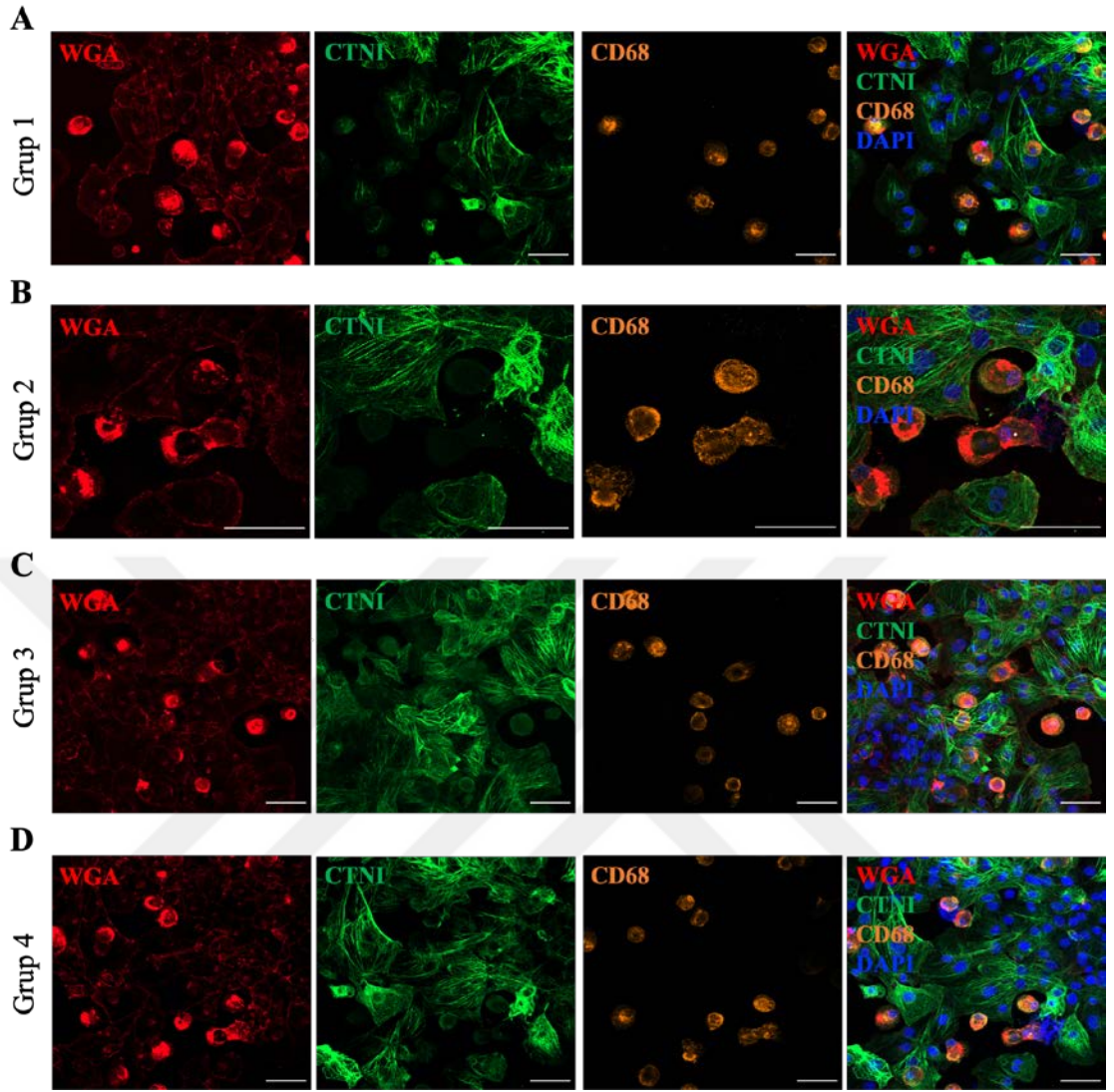
Özetle, kardiyomiyosit ve makrofaj bağlantılarını morfolojik olarak gözlemlmek amacıyla çeşitli ışık mikroskobu teknikleri ile fiziksel etkileşimler ilk 7 gün boyunca incelendi, daha sonra moleküler incelemelere ve fonksiyonel kasılma analizlerine geçildi.

6.2.18 Tekli ve kokültürlerde immünohistokimyasal incelemeler

Kokültürlerde kardiyomiyositler ve makrofajların temas kurduğu bölgeler ışık mikroskobu ile gözlemlendikten sonra, bağlantı bölgeleri WGA-temelli canlı membran boyaması ile teyit edildi. Tekli kardiyomiyosit (Şekil 6.48 A), makrofaj (Şekil 6.48 B) kültürü ve kokültürlerde (Şekil 6.48 C) hücrelerin membranları önce canlı kültürde konjuge WGA-647 antikoru ile işaretlendi, ardından kültürler fikslenerek immünboyamaları gerçekleştirildi (Şekil 6.48). WGA canlı boyamasında tüm hücrelerin membranları boyanırken ve makrofaj hücrelerinin membranının yanı sıra sitozolik bölgeleri de yoğunlukla WGA⁺ gözlemlendi. Çünkü insan CD68 proteini ve fare ortoloğu makrosialin proteini, lizozomal membranda yerleşik olup yüksek derecede glikozilleşmiş yapıdadır ve makrofajların lizozomik içerikleri çok yüksek olduğu için kültürler fikslenince membranlardaki WGA-647 sinyali azalırken makrofaj hücrelerin içindeki ışımalar devam etmektedir.



Şekil 6.48 Tekli ve kokültürlerde membran temelli canlı boyamalar. (A) UPKH-kökenli kardiyomiyositler ve (B) Makrofaj tekli kültürlerde ve (C) Kokültürlerde WGA-647 işaretlemesi yapılmış canlı membran boyamaları. Ölçek çubuğu: 50 µm.

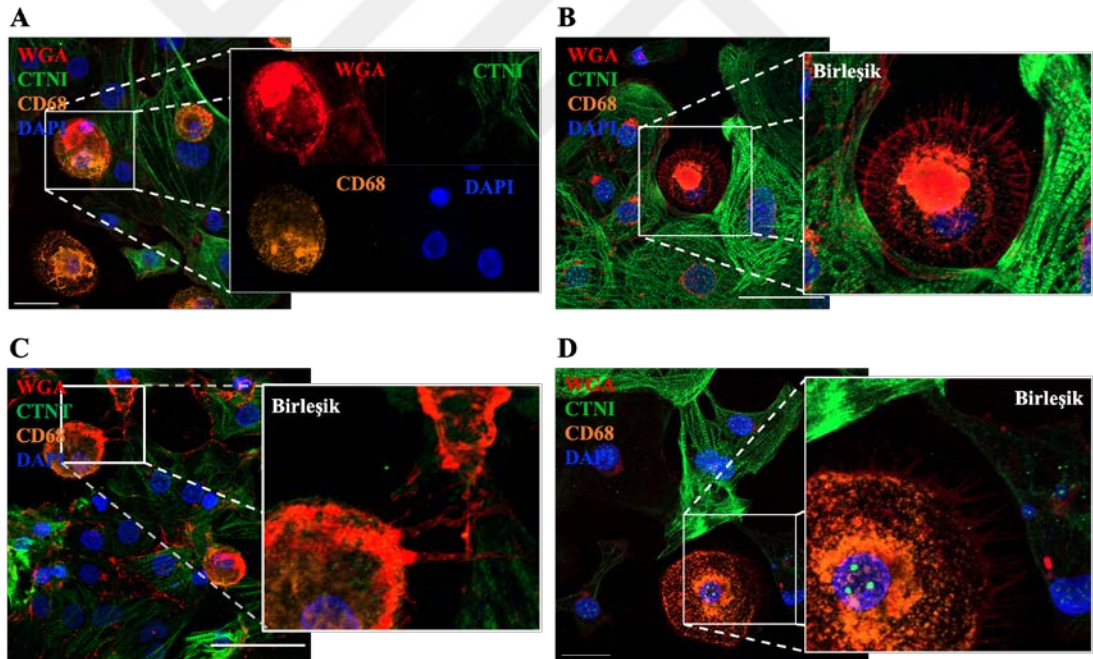


Şekil 6.49 Kokültürlerde membran temelli immünohistokimyasal incelemeler. (A) Grup 1, (B) Grup 2, (C) Grup 3 ve (D) Grup 4 kokültürlerde WGA-temelli canlı membran boyanmasından sonra anti-CTNI ve anti-CD68 ile gerçekleştirilen immünboyamanın konfokal floresan mikroskop görüntüleri. CTNI: Kardiyak troponin I. DAPI: Çekirdek boyası. Ölçek çubuğu: 50 μ m.

Tüm tekli ve kokültürlerdeki kardiyomiyositlerde morfolojik olarak gözlemlenen senkronize kasılmalarla tutarlı olarak, bu hücrelerde kardiyomiyositlere özgü proteinlerin varlığı ve fonksiyonel olarak sarkomerik yapıların oluştuğu anti-CTNI (Şekil 6.49) ve anti-CTNT (Şekil 6.54) antikorları ile immünboyamalar sonucu teyit edildi. Kokültürlerdeki makrofajlar ise anti-CD68 antikoruna ile işaretlendi (Şekil 6.49, Şekil 6.54). Kardiyomiyositler ve makrofajların etkileşim kurduğu bölgelerde,

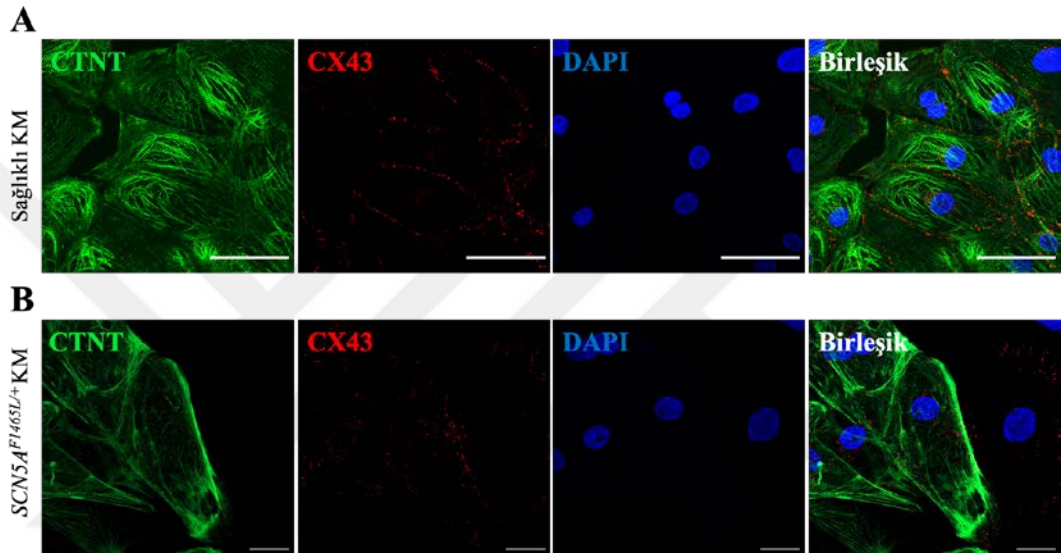
membrana özgü glikozillenmiş lektin benzeri yapıları işaretleyen spesifik membran işaretleyicisi WGA-647 antikor boyanması pozitif olarak gözlemlendi (Şekil 6.49 A-D).

Kokültürlerde WGA temelli immünboyamalarda makrofaj ve kardiyomiyosit hücreleri arası membran etkileşimleri detaylı bir şekilde incelendiğinde, bir makrofajın yüksek CTNT ifadesi gösteren kardiyomiyositler ile membran etkileşimine girdiği gözlemlendi (Şekil 6.50 A). Kokültürlerde başka bir alanda CD68⁺ makrofaj, WGA⁺ membran uzantıları ile kümeleşmiş kardiyomiyosit hücrelerine bağlandığı görüldü (Şekil 6.50 B). WGA⁺ membran uzantılarına sahip başka bir makrofaj hücresinin, düşük CTNT ifadesi gösteren bir kardiyomiyosite doğru uzandığı tespit edildi (Şekil 6.50 C). İlginç olarak, yüksek CTNT ifadesi gösteren kardiyomiyosit hücresinin yakınında bulunan bir makrofaj hücresinin düşük CTNT ifadeli bir hücreye doğru uzattığı membran çıkıntıları net bir şekilde tespit edildi (Şekil 6.50 D).



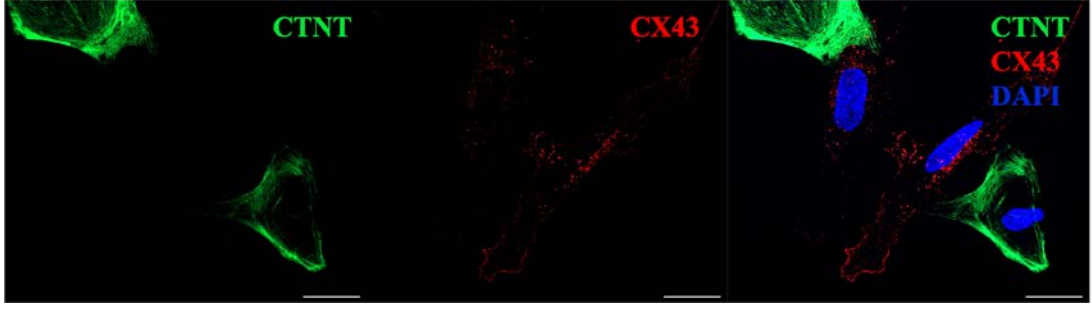
Şekil 6.50 Kokültürlerde membran etkileşimlerinin detaylı immünohistokimyasal incelemeleri. Kokültürlerde WGA-temelli canlı membran boyanmasından sonra anti-CTNT ve anti-CD68 ile gerçekleştirilen immünboyamaların ileri magnifikasyonlarda konfokal floresan mikroskop görüntüleri. Şekiller (A) 2,5X, (B) 5X, (C) 10X, (D) 6X olarak yakınlştırılmıştır. CTNT: Kardiyak troponin T. DAPI: Çekirdek boyası. Ölçek çubuğu: 50 µm.

Kokültürlerdeki kardiyomiyosit ve makrofaj hücre etkileşimlerinin CX43 oluklu bağlantı proteini analizinden önce, tekli kardiyomiyosit kültürlerinde anti-CTNT ve anti-CX43 antikorum ile immünboyamalar gerçekleştirildi. Sağlıklı (Şekil 6.51 A) ve *SCN5A*^{F1465L/+} mutasyonu taşıyan taşikardik kardiyomiyosit (Şekil 6.51 B) kültürlerinde, Cx43 proteinin kardiyomiyositlerin hücre içleri ve hücreler arası etkileşimlerin olduğu membran bağlantılarında lokalize olduğu gözlemlendi.



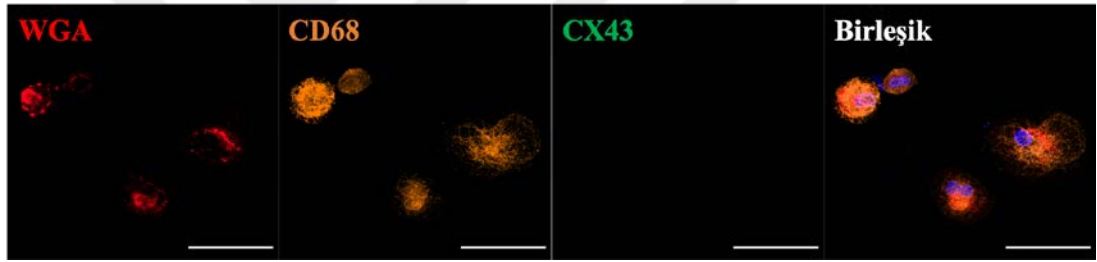
Şekil 6.51 Sağlıklı ve konjenital aritmi hasta kökenli kardiyomiyosit tekli kültürlerinde CX43 immünboyamaları. (A) Sağlıklı bireyden ve (B) *SCN5A*^{F1465L/+} mutasyonlu hasta bireyden elde edilmiş kardiyomiyosit kültürlerinde anti-CTNT ve anti-CX43 ile gerçekleştirilen immünboyamaların konfokal floresan mikroskop görüntüleri. N=2. DAPI: Çekirdek boyası. Ölçek çubuğu: 50 µm.

Kardiyak kültürlerde kardiyomiyosit hücrelerinin yanısıra kardiyak fibroblastlar ve endoteller gibi kardiyomiyosit olmayan hücreler de bulunmaktadır. CX43 proteinleri kardiyomiyositler ve kardiyomiyosit olmayan hücrelerin membrane temas kurduğu membran bölgelerinde pozitif şekilde gözlemlendi (Şekil 6.52).



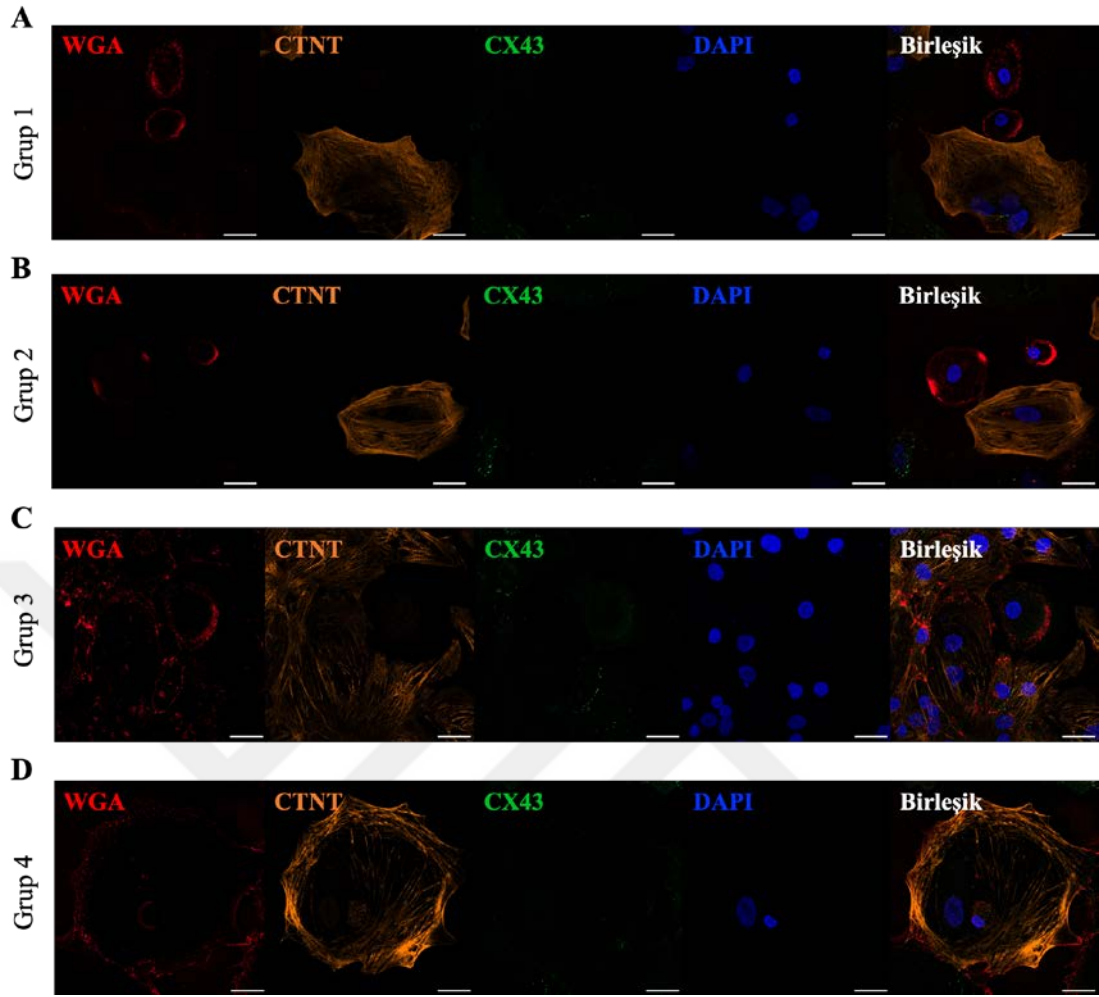
Şekil 6.52 Kardiyak kültürlerde kardiyomiyosit ve kardiyomiyosit olmayan hücre arasında gözlenen CX43 immünboyaması. Sağlıklı kardiyomiyosit kültürlerinde anti-CTNT ve anti-CX43 ile gerçekleştirilen immünboyamanın konfokal floresan mikroskop görüntüsü. N=3. DAPI: Çekirdek boyası. Ölçek çubuğu: 50 µm.

Tekli makrofaj kültürlerinde anti-CX43 ile gerçekleştirilen immünboyamalarda, makrofaj hücrelerinde CX43 ifadesi gözlenmedi (Şekil 6.53).



Şekil 6.53 Makrofaj tekli kültürlerinde CX43 immünboyaması. Makrofaj kültüründe WGA-647, anti-CD68 ve anti-CX43 ile gerçekleştirilen immünboyamanın konfokal floresan mikroskop görüntüsü. N=2. DAPI: Çekirdek boyası. Ölçek çubuğu: 50 µm.

Tekli kardiyak kültürlerde kardiyomiyosit arasında CX43 proteinleri tespit edilmesine rağmen (Şekil 6.51), kokültür gruplarında kardiyomiyosit ve makrofajlar arasında CX43 proteini açısından herhangi bir pozitif immünreaktivite gözlenmedi (Şekil 6.54). Bununla birlikte, kokültür gruplarında CX43 proteini ifadesi, tekli kardiyak kültürlerdeki gibi kardiyomiyosit hücrelerinde yer yer pozitif olarak gözlemlendi (Şekil 6.54).



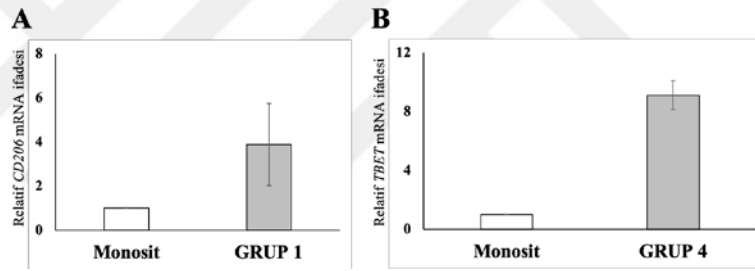
Şekil 6.54 Kokültürlerde CX43 immünohistokimyasal incelemeler. (A) Grup 1, (B) Grup 2, (C) Grup 3 ve (D) Grup 4 kokültürlerde WGA membran boyanmasından sonra anti-CTNT ve anti-CX43 ile gerçekleştirilen immünboyamaların konfokal floresan mikroskop görüntüleri. DAPI: Çekirdek boyası. Ölçek çubuğu: 50 µm.

Kokültür gruplarında yer alan makrofajların M1-M2 polarizasyonu açısından moleküler analizlerinin immünboyamalarında anti-iNOS antikoruna bir kez denendi ve hiçbir kokültür grubunda makrofaj veya kardiyomyosit hücrelerinde immünreaktivite gözlenmedi.

6.2.19 Kokültürlerde kantitatif RT-PZR ile gen ifade analizleri

Kokültür gruplarında yer alan makrofajların moleküler analizlerinde, kantitatif RT-PZR yöntemi kullanıldı. Bu yöntem ile immünboyamaya kıyasla daha fazla sayıda M1/M2 makrofaj fenotipi belirtecini değerlendirme avantajı bulunmaktadır. M1

polarizasyonu açısından *IL-1B*, *CD86*, *TBET*, *IFN-γ*, M2 polarizasyonu açısından *IL-10*, *CD206* ve *STAT6* gen ifadeleri araştırıldığında, M2 fenotipi belirteci *CD206* mRNA ifadesinin sağlıklı birey kökenli makrofajların oluşturduğu Grup 1 kokültürlerde, makrofajların köken aldığı monosit hücrelerine oranla yüksek olduğu tespit edildi ($P=0,1694$, Şekil 6.55 A). *SCN5A*^{F1465L/+} mutasyonu taşıyan taşikardik kardiyomiyositler ile *SCN5A*^{delKPQ/+} mutasyonu taşıyan hasta kökenli makrofajların oluşturduğu Grup 4 kokültürlerinde ise, M1 fenotipi belirteci *TBET* mRNA ifadesinde hasta kökenli monosit hücrelerine oranla artış tespit edildi ($P=0,0538$, Şekil 6.55 B). Kokültürlerdeki gen ifadelerinde gözlenen bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildi. Diğer bahsedilen genlerin kokültürlerdeki mRNA seviyelerinde, tekli makrofajlara ve monositlere oranlandığında herhangi bir amplifikasyon gözlenmedi, bu nedenle bu gen ifadeleri kokültür kantitatif RT-PZR analizlerine ddahil edilmedi.

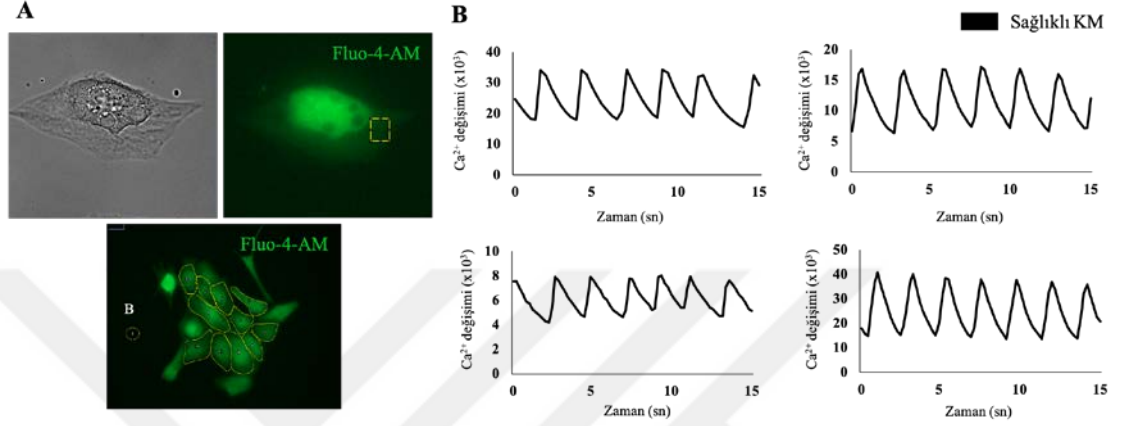


Şekil 6.55 Kokültürlerde kantitatif RT-PZR ile M1/M2 makrofaj fenotipleri gen ifade analizleri. (A) Grup 1 kokültürde *CD206* mRNA ifadesi ve (B) Grup 4 kokültürde *TBET* mRNA ifadesini gösteren grafikler. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiştir. N=2.

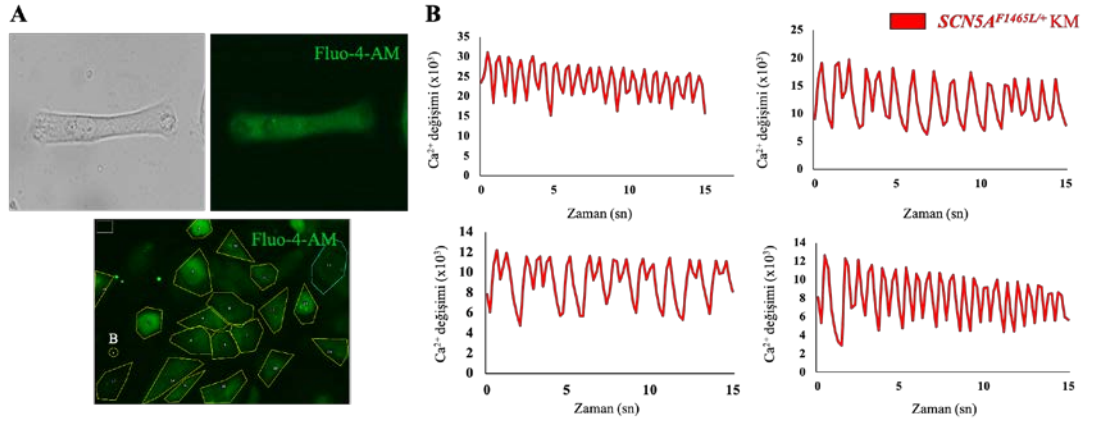
6.2.20 Tekli ve kokültürlerde hücre içi Ca^{+2} analizleri

Tekli kardiyomiyosit kültürleri ve kokültürlerde, kardiyak kasılma ve gevşeme döngüleri sırasında gerçekleşen Ca^{+2} iyon değişiminin incelendiği hücre içi Ca^{+2} görüntülemeleri eş zamanlı olarak yapıldı. Analizler için, sağlıklı ve taşikardik kardiyomiyosit kültürlerinde kayıt edilen Ca^{+2} iyon değişimi videolarından 50 rastgele alan seçildi. ImageJ programı kullanılarak bu alanlardan, yeşil floresan ışığa veren Fluo-4-AM ile yüklü sağlıklı (Şekil 6.56 A) ve *SCN5A*^{F1465L/+} mutasyonu taşıyan taşikardik kardiyomiyositlerin (Şekil 6.57 A) hücre sınırları seçildi ve 15 saniyelik floresan değişimini gösteren Ca^{+2} iyon değişimi grafikleri oluşturuldu (Şekil 6.56 B,

Şekil 6.57 B). Bu grafiklerdeki veriler incelendiğinde, *SCN5A*^{F1465L/+} mutasyonu taşıyan hasta kökenli kardiyomiyositlerin birim zamandaki Ca^{+2} değişimine bağlı kasılma hızlarının sağlıklı gruba kıyasla daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 6.56 B, Şekil 6.57 B, Şekil 6.58).

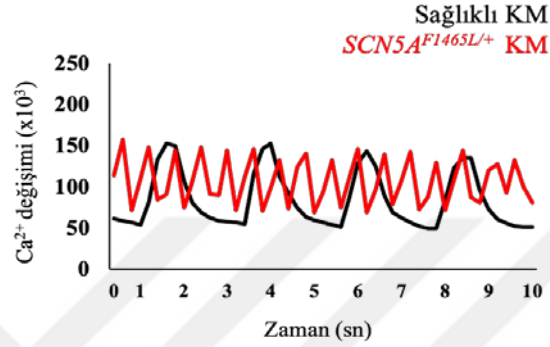


Şekil 6.56 Sağlıklı tekli kardiyomiyosit kültürlerinde hücre içi Ca^{+2} değişim grafikleri. (A) Fluo-4-AM boyası yüklenmiş sağlıklı uPKH-kökenli kardiyomiyosit kültürlerinden Spinning Disk Konfokal mikroskobu görüntüsü. (B) Sağlıklı kardiyomiyosit kültürlerinin değişik bölgelerinden hesaplanmış 15 saniyelik hücre içi Ca^{+2} iyonu akış grafikleri. Ca^{+2} : Kalsiyum. Sn: saniye. KM: Kardiyomiyosit.

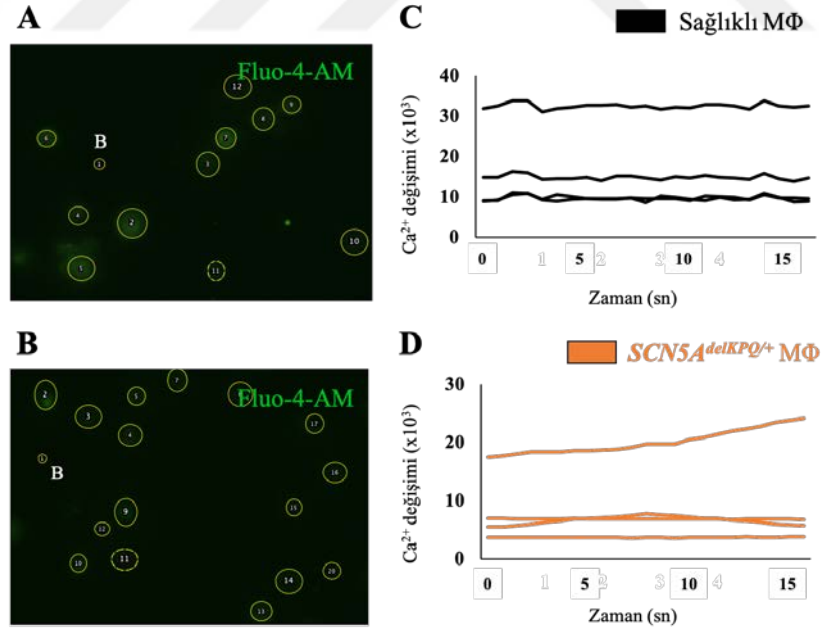


Şekil 6.57 Hasta kökenli tekli kardiyomiyosit kültürlerinde hücre içi Ca^{+2} değişim grafikleri. (A) Fluo-4-AM boyası yüklenmiş taşikardik uPKH-kökenli kardiyomiyosit kültürlerinden Spinning Disk Konfokal mikroskobu ile kaydedilmiş görüntüsü. (B) Hasta kökenli kardiyomiyosit kültürlerinin değişik bölgelerinden hesaplanmış 15 saniyelik hücre içi Ca^{+2} iyonu akış grafikleri. Ca^{+2} : Kalsiyum. Sn: saniye. KM: Kardiyomiyosit.

Bununla birlikte, iki grubun 10 saniyelik ortalama hücre içi Ca^{+2} değişimi grafiklerini karşılaştırdığımızda ise, sağlıklı kardiyomiyositlerde kasılma eğrilerinin paterni ritmik gözlenirken, ventriküler taşikardi hastasından oluşturulmuş kardiyomiyositlerde hastalığın EKG bulgusu olan aritmik ve taşikardik bir patern gözlemlendi (Şekil 6.56 B, Şekil 6.57 B, Şekil 6.58).



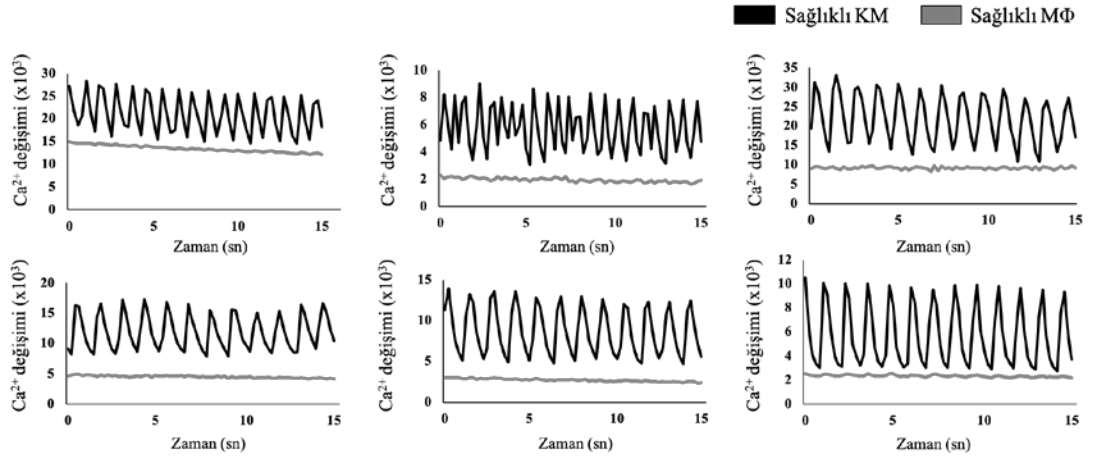
Şekil 6.58 Tekli kardiyomiyosit kültürlerinin karşılaştırmalı ortalama hücre içi Ca^{+2} değişimi grafiği. Ca^{+2} : Kalsiyum. Sn: saniye. KM: Kardiyomiyosit.



Şekil 6.59 Tekli makrofaj kültürlerinin hücre içi Ca^{+2} görüntüleme analizleri. Fluo-4-AM boyası yüklenmiş (A) sağıklı ve (B) $SCN5A^{delKPQ/+}$ mutasyonu taşıyan hasta grubu makrofajların Spinning Disk Konfokal mikroskobu ile kaydedilmiş 40X görüntüleri. (C) Sağıklı ve (D) hasta grubuna ait makrofajlarda 15 saniyelik hücre içi Ca^{+2} iyonu akış grafiği. Ca^{+2} : Kalsiyum. B: Background (arkaplan). Sn: saniye. MΦ: Makrofaj.

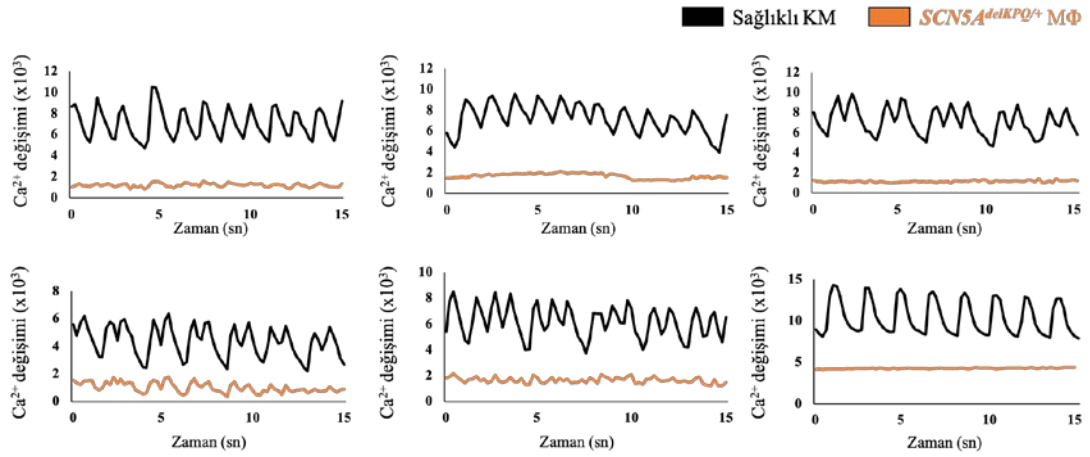
Hücre içi Ca^{+2} görüntüleme protokolü, kontrol grubu olarak makrofaj kültürlerinde de uygulandı. Sağlıklı makrofajlar (Şekil 6.59 A) ve $\text{SCN5A}^{\text{delKPQ/+}}$ mutasyonu taşıyan UQTS-3/Brugada sendromu hastası bireyden elde edilmiş makrofajların (Şekil 6.59 B) hücre sınırları ImageJ programında seçildi ve bu alan içerisindeki 15 saniyelik zamana bağlı floresan değişimini gösteren iyon değişim grafikleri oluşturuldu (Şekil 6.59 C, D). Makrofaj kültürleri uyarılabilen (excitable) hücreler olmadığı için Fluo-4-AM boyaması sonucu hücrelerde herhangi bir Ca^{+2} iyon değişimi gözlenmedi (Şekil 6.59 C, D).

Fluo-4-AM ile boyanan kültürlerde görüntüleme sırasında ve Ca^{+2} değişimi analizi sonucunda, tek başına ekilen makrofaj kültürlerinde floresan değişim gözlemlenmezken (Şekil 6.59), tüm kokültür gruplarında kardiyomiyositler ile temas halindeki makrofajlarda çeşitli seviyelerde Ca^{+2} iyon hareketi tespit edildi (Şekil 6.60, Şekil 6.61, Şekil 6.62, Şekil 6.63). Öncelikle, grup 1 kokültürlerde sağlıklı kardiyomiyositler ile sağlıklı makrofajlar birlikte ekildiğinde kardiyomiyositlerin Ca^{+2} iyon değişimi hızının dolayısıyla kasılmanın yüksek oranda arttığı tespit edildi (Şekil 6.60).



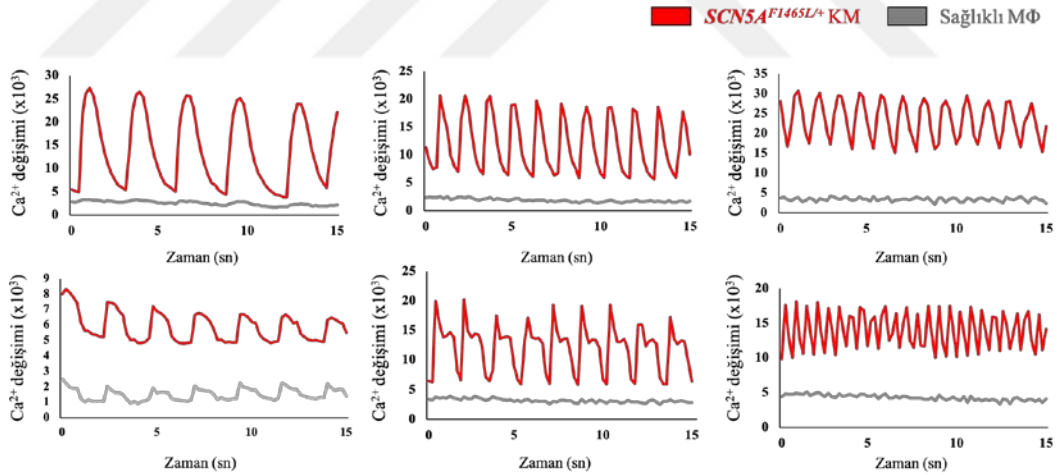
Şekil 6.60 Grup 1 kokültürlerde hücre içi Ca^{+2} görüntüleme analizi grafikleri. Ca^{+2} : Kalsiyum. Sn: saniye. KM: Kardiyomiyosit. MΦ: Makrofaj.

Grup 2 kokültürlerde sağlıklı kardiyomiyositler ile $\text{SCN5A}^{\text{delKPQ/+}}$ mutasyonlu hasta makrofajlar birlikte ekildiğinde kardiyomiyositlerde Ca^{+2} iyon değişimi hızının arttığı ve kasılmanın ritminin bozulduğu belirlendi (Şekil 6.61).



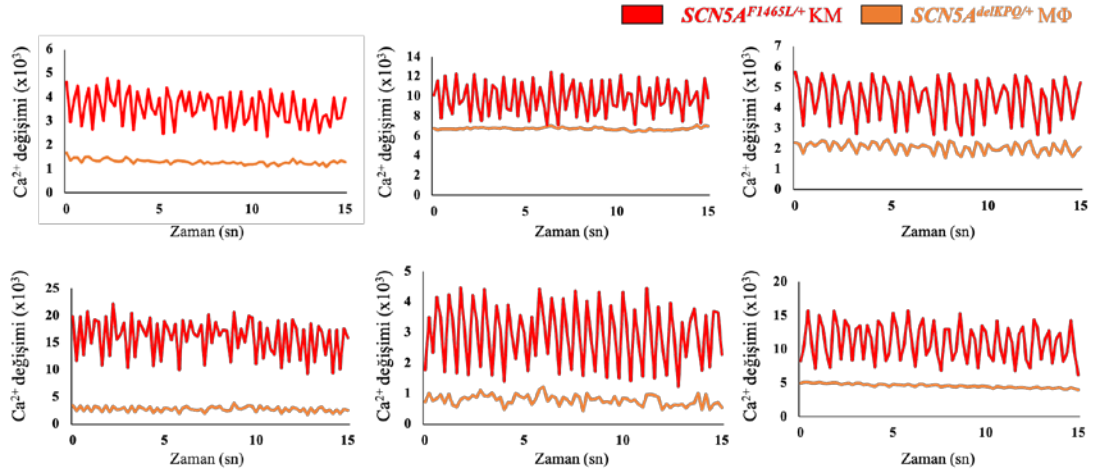
Şekil 6.61 Grup 2 kokültürlerde hücre içi Ca^{+2} görüntüleme analizi grafikleri. Ca^{+2} : Kalsiyum. Sn: saniye. KM: Kardiyomiyosit. MΦ: Makrofaj.

Grup 3 kokültürlerde $\text{SCN5A}^{F1465L/+}$ mutasyonlu taşikardik kardiyomiyositler ile sağlıklı makrofajlar birlikte ekildiğinde, kardiyomiyositlerin Ca^{+2} iyon değişimi hızının azaldığı ve kasılmanın döngülerinin bazı grafiklerde ritmikleştiği belirlendi (Şekil 6.62).



Şekil 6.62 Grup 3 kokültürlerde hücre içi Ca^{+2} görüntüleme analizi grafikleri. Ca^{+2} : Kalsiyum. Sn: saniye. KM: Kardiyomiyosit. MΦ: Makrofaj.

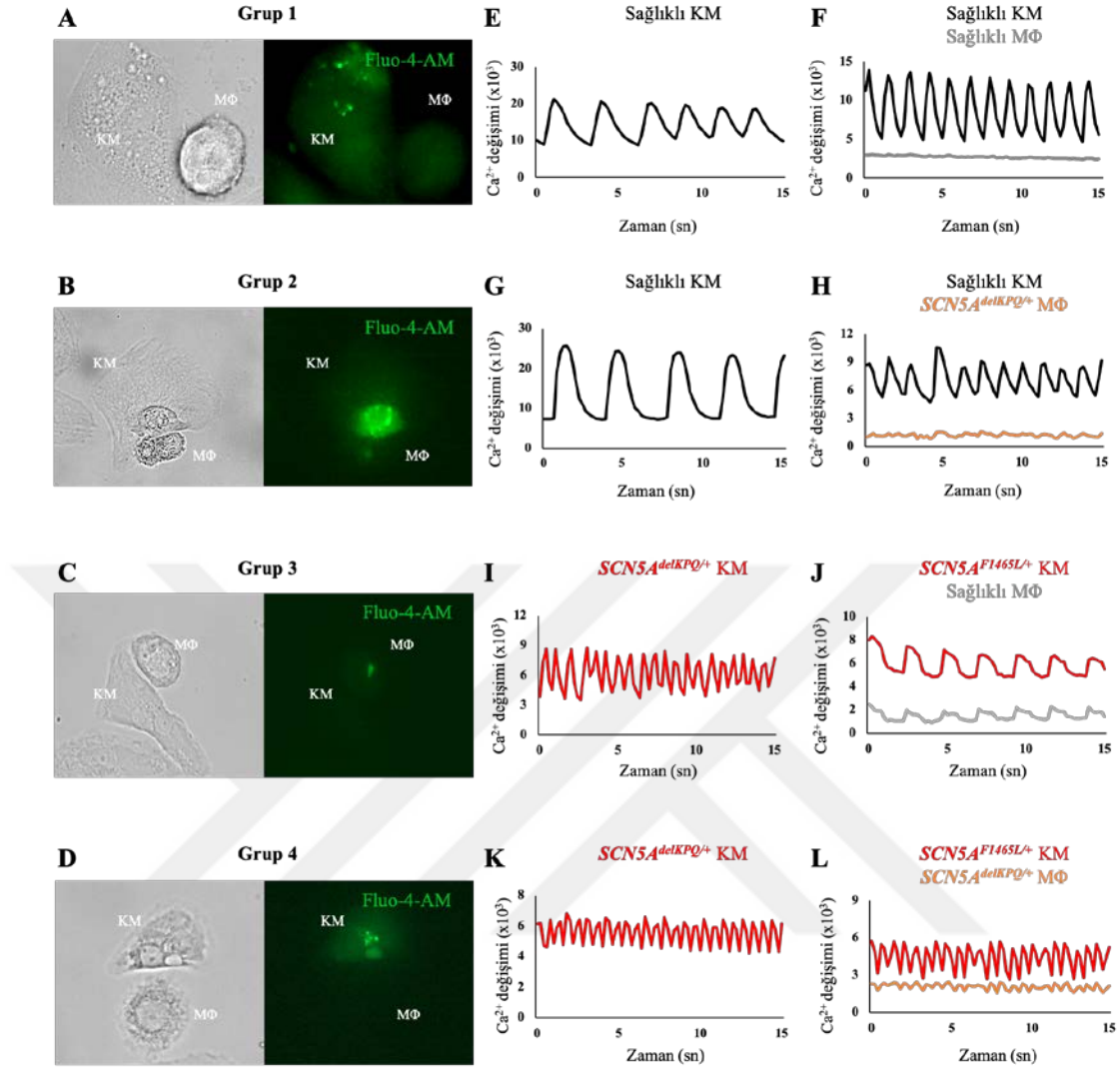
Grup 4 kokültürlerde $\text{SCN5A}^{F1465L/+}$ mutasyonlu taşikardik kardiyomiyositler ile $\text{SCN5A}^{\text{delKPQ}/+}$ mutasyonlu hasta kökenli makrofajlar birlikte ekildiğinde, kardiyomiyositlerde Ca^{+2} iyon değişimi hızında bir değişiklik olmadı ve tekli taşikardik kardiyomiyosit kültürlerindeki gibi aritmik patern gözlemlendi (Şekil 6.63).



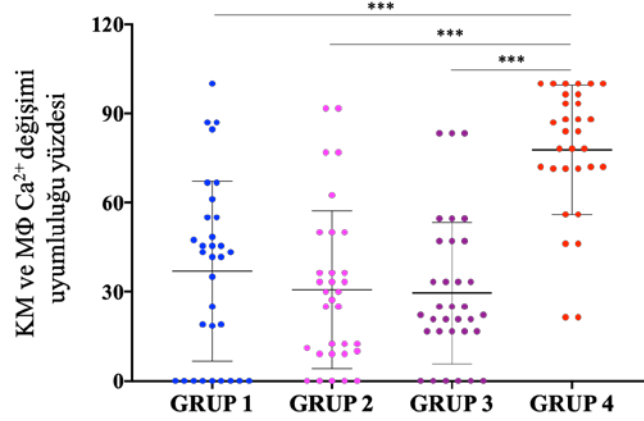
Şekil 6.63 Grup 4 kokültürlerde hücre içi Ca^{+2} görüntüleme analizi grafikleri. Ca^{+2} : Kalsiyum. Sn: saniye. KM: Kardiyomiyosit. MΦ: Makrofaj.

Tüm kokültür grup setlerindeki hücre içi Ca^{+2} görüntüleme analizleri incelendiğinde, Grup 1 ve Grup 2 kokültürlerdeki makrofajların genetik kökeni farketmeksizin, kardiyomiyositlerin iyon akış hızını arttırdığı, Grup 3 kokültürlerde sağlıklı makrofajların taşikardik kardiyomiyositlerin iyon akış hızını azalttığı dikkati çekmektedir. Grup 4 kokültürlerdeki kardiyomiyositlerin Ca^{+2} iyon değişimi hızında bir değişiklik olmadığı ve aritmik atım profilinin sürdüğü gözlenmiştir (Şekil 6.64).

Kokültürlerdeki makrofajlar ile kardiyomiyositler arasındaki Ca^{+2} iyonuna bağlı floresan değişimlerin korelasyon analizi yapıldığında, korelasyon yüzdeleri Grup 1 için $36,93 \pm 28,90$, Grup 2 için $30,69 \pm 29,27$, Grup 3 için $29,52 \pm 22,18$, Grup 4 için $77,75 \pm 23,09$ olarak hesaplandı (Şekil 6.65). Grup 4 kokültürlere ait hücrelerin iyon değişimlerinde tespit edilen ortalama korelasyon değeri, diğer gruplara oranla istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulundu ($P < 0,0001$, Şekil 6.65). *SCN5A* p.F1465L ve p.1505-1507delKPQ mutasyonlarını taşıyan hücrelerin oluşturduğu Grup 4 kokültürlerdeki yüksek korelasyon değeri, her iki mutasyonun fonksiyon kazanımı çeşidinde olmasından dolayı hücreler içi veya arası iyonik aktivitenin artışından kaynaklanabilir.



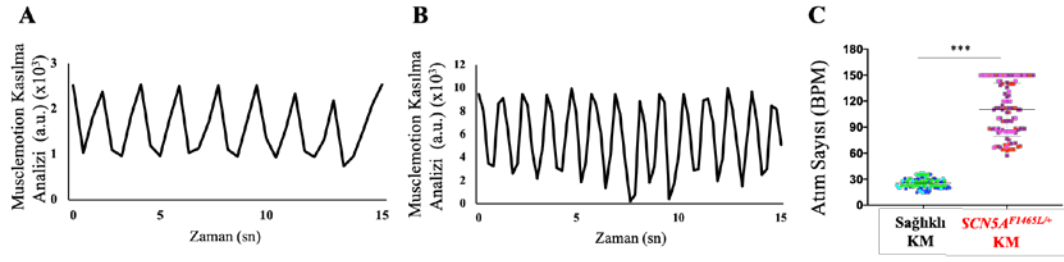
Şekil 6.64 Kokültürlerde hücre içi Ca^{+2} görüntülemeleri. Fluo-4-AM boyası yüklenmiş (A) 1. grup, (B) 2. grup, (C) 3. grup ve (D) 4. grup kokültürlerde kardiyomiyosit ve makrofaj hücrelerinin membran temasını içeren representatif bölgelerin aydınlık alan ve 488 nm dalga boyu altında Spinning Disk Konfokal mikroskopu ile kaydedilmiş 40X görüntüleri. (E) 1. grup, (F) 2. grup, (G) 3. grup ve (H) 4. gruba ait tekli kardiyomiyosit kültürlerine ait representatif hücrelerin 15 saniyelik hücre içi Ca^{+2} iyonu akış grafikleri. (I) 1. grup, (J) 2. grup, (K) 3. grup ve (L) 4. gruba ait kokültürlerdeki kardiyomiyosit ve makrofajların 15 saniyelik hücre içi Ca^{+2} iyonu akış grafikleri. Ca^{+2} : Kalsiyum. Sn: saniye. KM: Kardiyomiyosit. MΦ: Makrofaj.



Şekil 6.65 Kokültürlerde makrofajlar ile kardiyomiyositler arasında Ca^{+2} değişimlerinin korelasyon analiz grafiği. Ca^{+2} : Kalsiyum. KM: Kardiyomiyosit. MΦ: Makrofaj. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiştir. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

6.2.21 Tekli kültürlerde ve kokültürlerde MUSCLEMOTION fonksiyonel kasılma analizleri

Her gruba ait tekli kardiyomiyosit kültürleri ve kokültürlerde fonksiyonel kasılma analizleri eş zamanlı olarak gerçekleştirildi. MUSCLEMOTION isimli eklenti ile yapılan kasılma analizleri ile kardiyomiyositlerin atım profilleri ve dakikadaki atım sayıları BPM (Beats per minute) cinsinden belirlendi. Kokültürlerdeki kardiyomiyositlerde yapılacak kasılma analizlerinden önce, sağlıklı ve taşikardi hastası bireye ait tekli kardiyomiyosit kültürlerinde BPM sayıları incelendi. MUSCLEMOTION fonksiyonel kasılma analizleri sonucu, sağlıklı kardiyomiyositlerin atım profilleri ritmik ve düzenli eğriler şeklinde gözlenirken (Şekil 6.66 A), $\text{SCN5A}^{F1465L/+}$ mutasyonu taşıyan ventriküler taşikardi hasta kaynaklı kardiyomiyositlerde aritmik ve normalden daha hızlı atım frekansı tespit edildi (Şekil 6.66 B). Sağlıklı bireye ait kardiyomiyositlerin atım hızı $25,31 \pm 5,62$ BPM şeklinde hesaplandı (Şekil 6.66 C). $\text{SCN5A}^{F1465L/+}$ mutasyonu taşıyan uPKH kökenli kardiyomiyositlerin atım hızı ise $110,2 \pm 30,84$ BPM olarak tespit edildi ve hasta kökenli kardiyomiyositlerin ortalama BPM değeri sağlıklı gruba oranla beklenildiği üzere artmış şekilde belirlendi ($P < 0,0001$, Şekil 6.66 C).



Şekil 6.66 Tekli kardiyomiyosit kültürlerinde MUSCLEMOTION fonksiyonel kasılma analizleri. a.u.: arbitrary unit (rasgele birim). Sn: saniye. KM: Kardiyomiyosit. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiştir. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$.

Sağlıklı ve hasta grubu hücreleri ile oluşturulan kokültürlerdeki fonksiyonel kasılma analizleri, her kokültür grubu setine ait tekli kardiyomiyosit kültüründen alınan kasılma verileriyle karşılaştırıldı ve istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı (Şekil 6.67). Grup 1 kokültürlere ait sağlıklı kardiyomiyosit kültürlerinde kasılma hızı ortalama $24,05 \pm 6,17$ BPM şeklinde hesaplandı (Tablo 6.6, Şekil 6.67). Sağlıklı birey kökenli makrofajlar ile birlikte ekilen sağlıklı kardiyomiyositleri içeren kokültürlerde ise ortalama kasılma hızı $73,93 \pm 33,09$ BPM olarak tespit edildi (Tablo 6.6, Şekil 6.67). Sağlıklı kokültürlerin atım frekanslarındaki bu artışın tekli kardiyomiyosit kültürlerine oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiği belirlendi ($P<0,0001$, Tablo 6.6, Şekil 6.67).

Grup 2 kokültürlere ait sağlıklı kardiyomiyosit kültürlerinde kasılma hızı ortalama $26,62 \pm 4,71$ BPM şeklinde hesaplandı (Tablo 6.6, Şekil 6.67). *SCN5A*^{delKPQ/+} mutasyonu taşıyan hasta kökenli makrofajlar ile birlikte ekilen kardiyomiyositleri içeren kokültürlerde ise ortalama kasılma hızının $54,65 \pm 14,06$ BPM şeklinde istatistiksel anlamlı olarak arttığı belirlendi ($P<0,0001$, Tablo 6.6, Şekil 6.67).

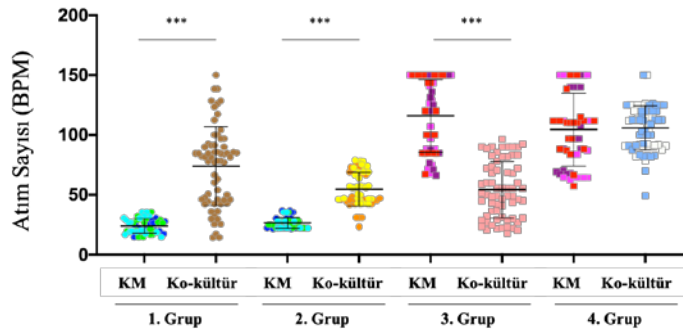
Grup 3 kokültürlerde, *SCN5A*^{F1465L/+} mutasyonu taşıyan tekli kardiyomiyosit kültürünün kasılma hızı ortalama $115,97 \pm 30,47$ BPM olarak hesaplandı (Tablo 6.6, Şekil 6.67). Sağlıklı birey kökenli makrofajlar ile birlikte ekilen taşikardik kardiyomiyositleri içeren kokültürlerde ise ortalama kasılma hızı $54,34 \pm 23,66$ BPM şeklinde hesaplandı. Sağlıklı makrofajlarla ekilen taşikardik kardiyomiyosit kültürlerindeki atım frekansının istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı belirlendi ($P<0,0001$, Tablo 6.6, Şekil 6.67). Sağlıklı makrofajların kardiyomiyositlere

balanmasıyla gerçekleşen bu azalma, makrofajların *in vitro* olarak hastalığın taşikardik fenotipini düzeltebildiğini ve iyileştirebildiğini göstermiştir.

Grup 4 kokültürlerde ise, $SCN5A^{F1465L/+}$ mutasyonu taşıyan taşikardik kardiyomiyositlerin tekli kültürlerdeki kasılma hızları $104,51 \pm 30,42$ BPM şeklinde hesaplandı. Kokültürlerde $SCN5A^{F1465L/+}$ mutasyonu taşıyan taşikardik kardiyomiyositler, $SCN5A^{delKPQ/+}$ mutasyonu taşıyan hasta kökenli makrofajlar ile ekildiğinde kasılma hızları $103,12 \pm 18,57$ BPM olarak azaldığı belirlendi, fakat sadece kardiyomiyosit kültürü ile karşılaştırıldığında bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P=0,0762$, Tablo 6.6, Şekil 6.67).

Tablo 6.6 Kokültür gruplarının BPM değerleri. N: Analiz edilen hücre sayısı. BPM (Beats per minute): Dakika başına düşen atım sayısı. KM: uPKH-kökenli kardiyomiyosit. [§]Değişkenler *Student's t-test* ve *Mann-Whitney U test* ile analiz edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiştir. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$.

Gruplar		N	BPM	$P^{\S}$
#1	KM	54	$24,05 \pm 6,17$	3.7×10^{-18}
	Kokültür	64	$73,93 \pm 33,09$	
#2	KM	52	$26,62 \pm 4,71$	2.4×10^{-23}
	Kokültür	60	$54,65 \pm 14,06$	
#3	KM	53	$115,97 \pm 30,47$	3.2×10^{-16}
	Kokültür	66	$54,34 \pm 23,66$	
#4	KM	53	$104,51 \pm 30,42$	0,0762
	Kokültür	65	$103,12 \pm 18,57$	



Şekil 6.67 Kokültür grupları arası BPM değerlerinin karşılaştırılması. BPM: Dakika başına atım sayısı (Beats pers minute). KM: Kardiyomiyosit. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiştir. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$.

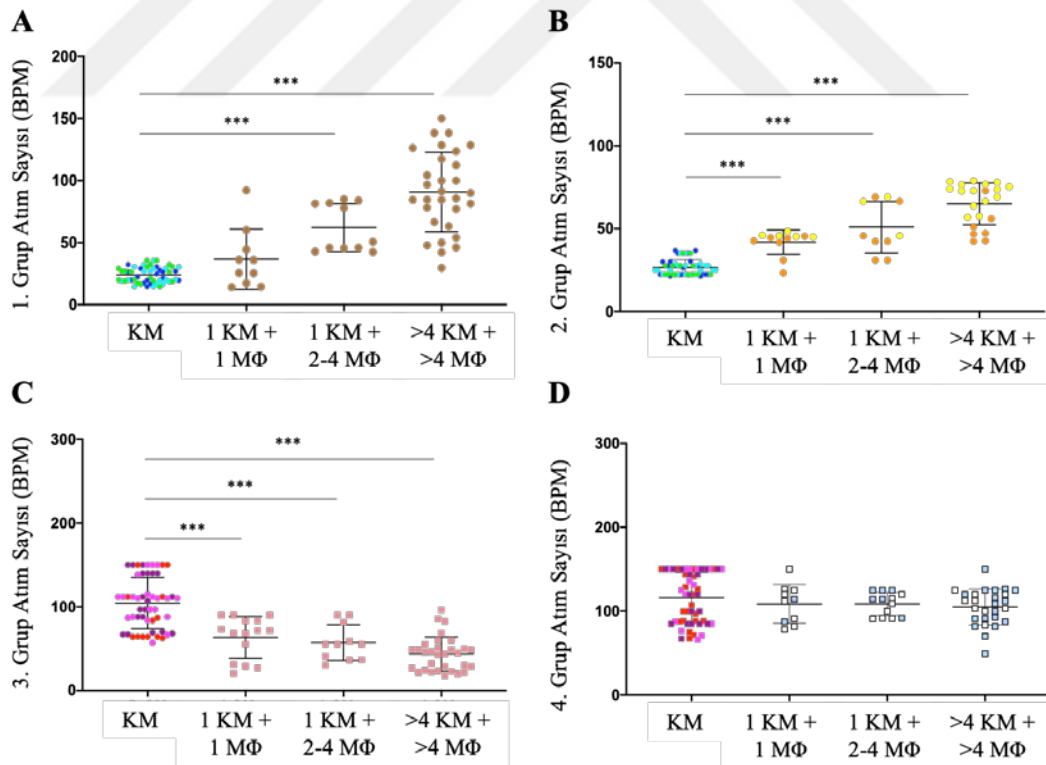
Literatürde yer alan Hulsmans ve arkadaşlarının çalışmasında (9), kardiyomiyositlere bağlanan makrofajların sayısının artırılmasıyla AV nod kardiyomiyositlere doğru daha fazla katyon akışı olduğu ve bu sebeple repolarizasyonun hızlanarak kalp atım frekasının arttığı fare modelinde *in vitro* olarak tespit edilmiştir. Buradan yola çıkarak biz bu tez çalışmasında, kokültürlerdeki aralarında membran teması kuran makrofaj ve kardiyomiyositleri içeren bölgelerin bağlantı sayılarına göre kokültür alt gruplarını oluşturduk. Bu alt gruplar;

- Bir kardiyomiyosit (KM) + bir makrofaj (MΦ),
- Bir kardiyomiyosit + 2-4 makrofaj ve
- Kümesel olarak, >4 kardiyomiyosit + >4 makrofaj bulunacak şekilde ayrıldı.

İlk olarak, Grup 1, 2 ve 3 kokültürlerinde kardiyomiyositlere bağlanan makrofajların sayısının değişmesiyle kasılma frekanslarının değiştiğini gördük (Tablo 6.7, Şekil 6.68). Grup 1 ve 2 kokültürlerde sağlıklı kardiyomiyositlere bağlanan makrofajların genetik kökeni farketmeksizin sayıları arttıkça, kardiyomiyositlerin ortalama BPM değerlerinde kademeli ve istatistiksel anlamlı olarak artış tespit edildi ($P<0,0001$, Tablo 6.7, Şekil 6.68). Önemli olarak, Grup 3 kokültürde taşikardik kardiyomiyositlere bağlanan sağlıklı makrofajların sayısı arttıkça, BPM değerlerinde kademeli ve istatistiksel anlamlı olarak azalma tespit edildi ($P<0,0001$, Tablo 6.7, Şekil 6.68). İlginç bir şekilde, Grup 4'ün tüm kokültür alt gruplarında taşikardik kardiyomiyositlerin ortalama BPM değerleri, tekli kardiyomiyositlerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermedi ($P=0,4450$, Tablo 6.7, Şekil 6.68). Sonuç olarak, sağlıklı veya konjenital aritmi hastalık kökenli makrofajlar sağlıklı kardiyomiyositlerin atım frekanslarını *in vitro* olarak hızlandırıcı etki göstermesine rağmen, sağlıklı makrofajlar ventriküler taşikardi hasta birey kökenli kardiyomiyositlerin atım frekansını düşürüp aritmik profilin ritmini düzenleyerek *in vitro* koşullarda iyileştirici bir etkisi olduğunu gösterdi.

Tablo 6.7 Kokültür alt gruplarının BPM değerleri. N: Hücre sayısı. BPM (Beats per minute): Dakika başına atım sayısı. KM: Kardiyomiyosit. MΦ: Makrofaj. Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Gruplar		1 KM + 1 MΦ	1 KM + 2 - 4 MΦ	> 4 KM + > 4 MΦ
#1	N	10	11	30
	BPM	36,61 ± 24,31	62,15 ± 19,27	90,74 ± 31,98
	P	0,7612	<0,0001	<0,0001
#2	N	12	11	22
	BPM	41,92 ± 7,28	34,97 ± 10,77	65,00 ± 12,61
	P	0,0006	<0,0001	<0,0001
#3	N	15	11	30
	BPM	63,6 ± 24,83	57,43 ± 21,43	43,62 ± 20,38
	P	0,0002	0,0004	<0,0001
#4	N	10	13	27
	BPM	108,6 ± 23,25	108,7 ± 13,85	104,9 ± 21,3
	P	>0,9999	>0,9999	0,3628



Şekil 6.68 Kokültür alt grupları arasında BPM değerlerinin karşılaştırılması. (A) Grup 1, (B) Grup 2, (C) Grup 3, (D) Grup 4 kokültürlerde alt grupların BPM sayılarını gösteren grafikler. BPM: Dakika başına atım sayısı. KM: Kardiyomiyosit. Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

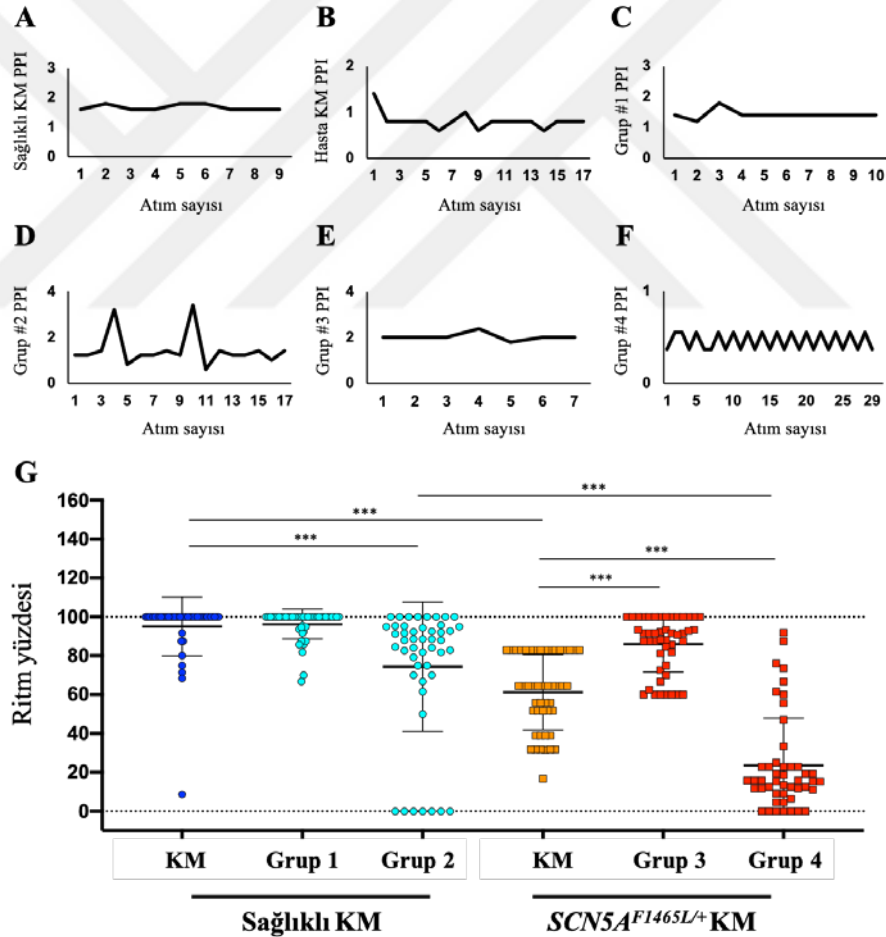
6.2.22 Tekli kültürlerde ve kokültürlerde ritim analizleri

Kokültürlerde makrofajların kardiyomiyositlerin ritim özelliklerini etkilediği hücre içi Ca^{+2} görüntülemeleri ve MUSCLEMOTION analizleri esnasında gözlemlendikten sonra, tekli kültürler ve kokültürlerdeki kardiyomiyositlerin fonksiyonel kasılma analizleri kullanılarak ritim analizleri gerçekleştirildi (Şekil 6.69). Kasılma grafiklerinde tespit edilen iki ardışık tepe arasındaki süre (PPI: peak-to-peak interval) değerleri hesaplandı (266). Sağlıklı tekli kardiyomiyosit kültürlerinde kasılmalar ritmik şekilde tespit edilirken ve bu durum düz çizgiler şeklinde gözlenirken (Şekil 6.69 A), *SCN5A^{F1465L/+}* mutasyonu taşıyan taşiaritmik kardiyomiyositlerdeki kasılmalar aritmik olayları temsil eden eğri çizgiler olarak kendini gösterdi (Şekil 6.69 B). Analizde, kayıtların alındığı zaman dilimi boyunca %100 tam ritmik kültür ve %0 tamamen aritmik davranış gösterdi. Ritmik aktivite sağlıklı kardiyomiyosit kültürlerinde $95,11 \pm 15,06$, taşiaritmik kardiyomiyositlerde $61,23 \pm 19,38$ olarak ölçüldü ve beklenildiği üzere hasta kökenli kardiyomiyositlerin klinik fenotiple tutarlı olarak ritim bozukluğu durumu istatistiksel olarak doğrulandı ($P < 0,001$, Şekil 6.69 G).

Sağlıklı ve *SCN5A* mutasyonu taşıyan makrofajların, kardiyomiyositlerin ritmik ve aritmik davranışı üzerindeki etkisini araştırmak için, tüm kokültür gruplarında ritim yüzdesel değerleri hesaplandı ve tekli kardiyomiyosit kültürleriyle karşılaştırıldı (Şekil 6.69). Ritim yüzdesi ortalama $96,34 \pm 7,62$ olarak hesaplanan Grup 1 kokültürlerde çoğunlukla ritmik bir kasılma profili gözlemlendi ve sağlıklı tekli kardiyomiyositlere oranla anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($P = 0,9852$, Şekil 6.69 A, C, G). *SCN5A^{delKPQ/+}* mutasyonu taşıyan hasta kökenli makrofajlar ile ekilen sağlıklı kardiyomiyositlerin ritmi, Grup 2 kokültürlerde ortalama $74,35 \pm 33,25$ şeklinde istatistiksel anlamlı olarak düşüş gösterdi ($P = 0,0002$, Şekil 6.69 B, D, G). Bu bulgular, sağlıklı makrofajların sağlıklı kardiyomiyositlerin kasılma ritmini etkilemediğini, *SCN5A* mutasyonuna sahip hasta kökenli makrofajların sağlıklı kardiyomiyositlerin aritmik kasılma profilini şiddetlendirdiğini gösterdi.

İlginç bir şekilde, taşiaritmik kardiyomiyositlerin $61,23 \pm 19,38$ olarak belirlenen ortalama ritmik aktiviteleri, sağlıklı makrofajların bulunduğu Grup 3 kokültürleri oluşturan *SCN5A* mutasyonuna sahip hasta kökenli kardiyomiyositlerin

ortalama ritim yüzdesini $85,98 \pm 14,33$ olacak şekilde arttırdığı tespit edildi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlılığa sahipti ($P<0,0001$, Şekil 6.69 E, G). Grup 4 kokültürlerde taşiaritmik kardiyomiyositlerin ritim profillerinin *SCN5A* mutasyonu taşıyan makrofajlar ile birlikte olduğu durumda kardiyomiyositlerin kasılma ritmi $23,58 \pm 24,33$ olarak belirlendi ve kardiyomiyositlerin kasılma profillerinde ciddi bir ritim bozukluğu oldu ve bu azalma tekli kardiyomiyositlere kıyasla istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.0001$, $P<0,0001$, Şekil 6.69 F, G). Ritim analizi sonuçlarına göre, sağlıklı makrofajların taşiaritmik fenotipi gösteren hasta kökenli kardiyomiyositlerin aritmik aktivitesini iyileştirdiğini, *SCN5A* mutasyonuna sahip hasta kökenli makrofajların hem sağlıklı hem de hasta kökenli kardiyomiyositlerin kasılma ritmini önemli ölçüde bozduğunu açıkça göstermiştir.



Şekil 6.69 Monokültür ve kokültürlerdeki kardiyomiyositlerin ritim analizleri. (A) Sağlıklı ve (B) *SCN5A* mutasyonu taşıyan kardiyomiyositlerin ve (C) Grup 1, (D) Grup 2, (E) Grup 3, (F) Grup 4 kokültürlerdeki kardiyomiyositlerin ritim analizleri. KM: Kardiyomiyosit. PPI: Peak-to-peak interval. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde gösterilmiştir. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$.

7. TARTIŞMA

Kardiyovasküler ve immün sistem arasındaki hücrel ve moleküler kökenli ilişkiler son yıllarda sıklıkla araştırılmaktadır (52, 96, 222). Konjestif kalp yetmezliği olan hastaların serum örneklerinde tespit edilen IL-6, IL1- β , IL-10 ve TNF- α gibi pro- ve anti-inflamatuvar sitokin seviyelerindeki artış, kardiyak hastalıkların oluşumu ve devamında immün sistemin rolü olduğuna işaret etmektedir (223). Literatürde transgenik fare modelleri kullanılarak yapılan ve sağlıklı kalpte bulunan doğal immün sistem elemanı makrofajların aynı zamanda hasar sonrası immünregülatör rollerini inceleyen çalışmalar bulunmaktadır (224–227). 2017 yılında Hulsmans ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmada fare ventriküler kardiyomiyositlerin düzensiz elektrofizyolojik profillerinin kardiyak makrofajlarla kurduğu fiziksel etkileşimler sonucu düzelebileceği keşfedilmiştir (9). Böylece kardiyak makrofajların kanıksanan inflamatuvar yanıt dışında bir rolü olarak, kalbin elektrofizyolojik özelliklerini regüle etme görevi tanımlanmış ve bu şekilde ‘immünoelektrofizyoloji’ terimi doğmuştur (112). Bu çalışma sonuçlarına dayanarak, konjenital aritmilerin patogeneğinde kardiyak makrofajların düzenleyici rolü olabileceği hipotezimiz gelişmiştir.

Hipotezimiz doğrultusunda yürütülen tez çalışmasında, konjenital aritmide makrofajların moleküler ve fonksiyonel rollerini, *ex vivo* olarak transgenik aritmi fare modeli ve *in vitro* olarak insan kökenli uPKH’lerden oluşturduğumuz kokültür sistemi kullanarak araştırdık. İnsan kökenli kardiyomiyosit ve makrofajlar arasındaki hem moleküler hem de fonksiyonel etkileşimleri inceleyen bir çalışmaya literatürde şimdiye kadar rastlanmamıştır.

7.1 CASQ2^{-/-} Farelerin AV Nod Bölgelerinde CX3CR1⁺ Kardiyak Makrofaj Yoğunluğunun Azalması

Transgenik fare modelleri sayesinde gen mutasyonları kaynaklı kardiyak iyon kanalı bozukluklarının altında yatan mekanizmalar etkili bir şekilde aydınlatılmaktadır (4). Bu tez çalışmasının *ex vivo* deneylerinde, Pfeiffer ve arkadaşlarının (62) C57BL/6 farelerde sarkoplazmik retikulum içerisinde kalsiyum iyonlarına bağlanan ve bir kontrolör görevi gören kalsekuestrin proteinini kodlayan *Casq2* gen dizisinin genomdan çıkartılmasıyla oluşturdukları, ventriküler taşikardi modeli homozigot

Casq2^{-/-} transgenik fareler kullanıldı. İlk aşamada, vahşi tip sağlıklı ve *Casq2*^{-/-} farelerin genotip-fenotip ilişkisini araştırmak için EKG analizleri yürütüldü. Klinikte EKG parametrelerinin yaşa ve cinsiyete göre farklılık gösterdiği bilinmektedir (228). Kardiyak makrofajların fare kalplerinde fareler yaşlandıkça azaldığı bilinmektedir (105). Bu nedenlerle deneylerimizde, cinsiyet açısından eşit sayıda ve literatürde en sık tercih edilen yaş aralığı olarak 6-12 haftalık yetişkin fare kullandık. Elimizde invazif bir ölçüm sistemi bulunmadığı için EKG kayıtları alınırken farelere sedatif ajanlar uygulandı. Vahşi tip ve *Casq2*^{-/-} farelerin EKG kayıtları analiz edildiğinde, normal koşullarda farelerin dinlenme anındaki kalp atım hızlarının 300-600 BPM arasında olması gerekirken, sedasyonda olan farelerin kalp atım hızlarını 300 BPM hızından düşük olarak tespit ettik. Diğer bir deyişle, analize alınan tüm farelerin kalp ritimlerinde normale göre bir yavaşlama durumu tespit edildi ve analizler bu doğrultuda gerçekleştirildi. Farelerin EKG verileri analiz edildiğinde, literatür bulgularıyla benzer olarak, ventriküler taşikardi modeli farelerin ortalama kalp atım hızının (288 BPM) vahşi tip farelere (192 BPM) oranla istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği hesaplandı. Bu sonuç farelerimizin ventriküler taşikardi fenotipi gösterdiğini doğruladı.

Casq2 geni çıkartılmış farelerin kardiyomiyositlerinde Ca^{2+} iyonlarını bağlayan kalsekuestrin protein eksikliğinden dolayı, Ca^{2+} iyonları hücre içinde daima serbest şekilde bulunmaktadır. Bu nedenle hücreler hızlı depolarizasyon sonrası repolarizasyon fazına giremeden tekrar depolarize olarak kasılır. Taşikardiye sebep olan bu durum, insanda EKG verilerinde ventriküler depolarizasyonu yansıtan QRS kompleksinin morfolojik bozukluklarına yol açabilir (189, 205). Bu tez çalışmasında literatürde ilk defa *Casq2*^{-/-} farelerin EKG verisinde, QRS komplekslerinde Q tepe noktasını, iki tepecik şeklinde (M-şekilli patern) gözlemledik. Literatürde bu modele, ventriküllere giden ileti sistemi bloğunun sebep olması sonucu ventriküler taşikardi hastalarının EKG bulgularında rastlanabildiği gösterilmiştir (189, 205). Fakat literatürde, *Casq2*^{-/-} farelerin EKG verilerinde QRS kompleksinin morfolojik bozukluklarının ortaya çıkabileceği ile bir bilgiye rastlanmamıştır.

Yapılan EKG analizleri ile konjenital aritmi hastalık modeli olduğu doğrulanan *Casq2*^{-/-} fareler ve vahşi tip sağlıklı farelerin kalp dokularındaki makrofaj hücreleri, anatomik, histolojik ve moleküler açıdan araştırıldı. İncelemeyi hedeflediğimiz

kardiyak makrofaj popülasyonu için kullandığımız CX3CR1 ve F4/80 belirteçleri, fetal dönemde dokuya yerleşen kardiyak makrofajlar için literatürde sık kullanılan iki belirteç olarak seçildi (123, 154, 207, 229, 230). Özellikle CX3CR1^{GFP/+} raportör (reporter) transgenik fare soyu, sağlıklı durumda veya kalbe verilen hasar sonrasındaki kardiyak makrofajların gelişimini ve popülasyonlarını inceleyen çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (231–234). Bu çalışmalarda, doğumdan önce organa yerleşen kardiyak doku makrofajların CCR2⁻CD11B⁺F4/80⁺CX3CR1⁺ fenotip sergilediği raporlanmıştır (105, 116, 235). Monosit kökenli ve kalbe gelişimsel süreçten sonra yerleşen kardiyak makrofajların ise, CCR2⁺CD11B⁺F4/80⁺CX3CR1⁻ fenotip sergilediği belirtilmiştir (128, 234, 236, 237). Ayrıca, CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların sağlıklı kalpte atriyoventriküler (AV) nod bölgesinde yoğun olarak bulunduğu belirtilmiş, kalbe verilen hasar sonrası CX3CR1⁺ makrofaj popülasyonunda azalma tespit edildiği ve düşük / orta seviyelerde CX3CR1 ifade eden makrofajların kemik iliğinden köken aldığı yayınlanmıştır (238). Bu azalma ile dolaşımdaki monositlerin kalpte sayısının arttığını tespit ederek hasarlı bölgede monosit kökenli makrofajların, doku makrofajlarının yerini aldığı gösterilmiştir (161). Tüm bu verilerin ışığında, monosit kökenli makrofajların CX3CR1 proteini için negatif olmaları veya düşük ifade göstermeleri, bize tespit etmeyi hedeflediğimiz CX3CR1 kemokin reseptörünün kardiyak doku makrofajları için daha güvenilir sonuç vereceğini işaret etmiştir. Bu doğrultuda bu tez çalışmasında, vahşi tip ve *Casq2*^{-/-} farelerin kalp dokularında AV nodu içeren tüm sağ atriyal bölgelerinden alınan doku kesitleriyle immünboyamalar gerçekleştirildi. Bu aşamadan önce, CX3CR1 ve F4/80 belirteçleri için kullandığımız antikorları dalak dokularında optimize ederken yaptığımız gözlemler sonucu, CX3CR1⁺ ve F4/80⁺ makrofajları dalak ve kalpte iki ayrı popülasyon şeklinde gözlemledik. Ek olarak, dalakta CX3CR1⁺ makrofajların F4/80⁺ makrofajlara oranla daha az sayıda olduğunu belirledik. Dalak, kan hücrelerinin oluşumu bakımından yüksek kapasiteye sahip bir organ olduğu için burada yolk kesesinden gelen fetal döneme ait makrofajlardan ziyade, monosit kökenli makrofajlar daha yoğun olarak bulunmaktadır (239). Dalak dokularında tespit ettiğimiz bu sonuçtan farklı olarak, kalp dokularında CX3CR1⁺ makrofajların F4/80⁺ makrofajlardan daha yoğun bulunduğunu tespit ettik. Bu bulgularımız doğrultusunda, literatürle uyumlu olarak CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların fetal gelişimde dokuya

yerleşen makrofaj popülasyonu, F4/80⁺ makrofajların ise monosit kökenli hücreler olabileceği sonucuna vardık. Yine de gelecek çalışmalarda, kalbin tüm alanlarında F4/80⁺ makrofaj alt popülasyonlarının detaylı olarak taranması gerekmektedir. Bununla birlikte, F4/80 genini baskılayan bir çalışmada, F4/80⁺ makrofajlar azaldıkça, CX3CR1⁺ makrofaj sayısının artması dikkati çekmiştir (240). Bu sebeple bu iki belirteci ifade eden makrofaj alt tiplerinin ayrı popülasyonlar olabileceği anlaşılmıştır. Bununla birlikte bu tez çalışmasında, F4/80-488 konjuge antikorunun işaretlediği bölgeleri kalbin otofloresan miyokardiyum dokusunda ayırtedilme güçlüğü yaşadığımızdan dolayı, deneylerimizde CX3CR1-647 konjuge antikoru kullandık. İmmünboyamalarımız sonucu, sağlıklı farelerde CX3CR1⁺ makrofajların en yoğun bulunduğu bölgeyi, Hulsmans ve arkadaşlarının (9) belirttiği gibi AV nod olarak tespit ettik. Analize alınan tüm farelerin kalp dokularında CX3CR1⁺ makrofajların genel dağılımı incelendiğinde ise, kardiyak makrofajlar AV nod haricinde kapakçıkların endotel hücreleri arasında, miyokardiyumda kardiyomiyositler arasında ve perikardiyumda literatürle uyumlu olarak gözlemlendi (112, 116). İlginç olarak, *Casq2*^{-/-} farelerin AV nod bölgelerindeki CX3CR1⁺ makrofajların yoğunluğu kalitatif olarak sağlıklı farelere oranla ciddi oranda az olarak tespit edildi, fakat bu farelerde CX3CR1⁺ makrofajların AV nod etrafındaki interatriyal septumdaki yerleşimleri normaldi. Bu gözlemin üzerine yapılan vahşi tip ve konjenital aritmi hastası fareler arasındaki CX3CR1⁺ makrofajların kantitatif yoğunluk analizi sonucu, *Casq2*^{-/-} farelerdeki kardiyak makrofaj yoğunluğunun vahşi tip farelere oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı belirlendi ($P < 0,0001$). Bu sonuç konjenital aritmi modeli transgenik fare soyu için bu tez çalışmasında ulaştığımız önemli bir bulgudur.

Bununla birlikte, literatürde *CX3CR1*^{GFP/+} farelerin kalp dokularından izole edilen miyofibriller arasında yerleşik gözlenen kardiyak makrofajların uzantısal şekilli hücreler olduğu gösterilmiştir (9, 116). Bu tez çalışmasında, vahşi tip ve *Casq2*^{-/-} farelerde tespit ettiğimiz kardiyak makrofajları morfolojik olarak incelediğimizde, tekli hücreler şeklinde bulunan yuvarlak morfolojili CX3CR1⁺ makrofajları epikardiyum ve endokardiyum gibi kalbin periferik ve endotel hücrelerince zengin bölgelerinde yoğun olarak gözlemledik. Dokuda yerleşik bulunan, fetal dönem kökenli oldukları bilinen ve AV nod içinde tespit edilen CX3CR1⁺ makrofajlar ise, kümesel halde ve birlikte lokalize oldukları için immünboyamalarda bu makrofajları daha

uzantısal ve geniş morfolojide gözlemledik. Literatür bulgusu ile uyumlu olarak (9,116) AV nod içindeki kardiyak makrofajları uzantısal şekilli gözlemlememizin yanında, diğer bölgelerde yuvarlak ve tekli hücreler şeklinde tespit ettiğimiz makrofajlar literatür için yeni bir bulgudur.

Kardiyak makrofajlarda makrofaj fenotipi ve CX3CR1 kemokin reseptörü ifade değişimi arasında bir ilişki olup olmadığını anlamak için yapılan literatür araştırmaları sonucu, sağlıklı dokuya ait yerleşik ve M2 polariteli makrofajların *CX3CR1* genini yüksek oranda ifade ettiği gözlenmiştir (161, 230, 240). Organ hasarı sırasında CX3CR1⁺ makrofajların yoğunluk değişimlerini inceleyen Lee ve arkadaşları (113), hücrede CX3CR1 kemokin reseptörü eksikliğunun pro-inflamatuvar sitokin ifadelerini ve pro-inflamatuvar monositlerin infiltrasyonunu artırarak hasarlı dokuda inflamasyon ve fibrozisi şiddetlendirdiğini göstermiştir. Aynı çalışmada, hasarlı bölgelerde bulunan CX3CR1⁺ makrofajların sağlıklı dokuya benzer olarak onarıcı tipte olan M2 fenotipli makrofajlara farklılaştığı belirtilmiştir (113). Kardiyak hasar durumunda ise, kalbe doğru monosit hücrelerinin göçü CX3CR1⁺ kardiyak makrofajlar tarafından düzenlenmektedir ve böylece M2 polarizasyon ilişkili rejenerasyon süreci tetiklenmektedir (241, 242). Aterosklerotik lezyonlarda, CX3CR1/CX3CL1 etkileşiminin kalbe pro-inflamatuvar monositlerin göçünü ve köpük hücre makrofajlarının polarizasyonunu düzenlediği tespit edilmiştir (243). CX3CR1 kemokin reseptör yolağındaki aktivasyon durumu aynı zamanda plateletlerin vasküler hücrelere tutunma eğilimini arttırmaktadır (244). İlginç olarak, insan serum örneklerinde artmış olarak tespit edilen çözülebilir CX3CL1 ligand protein seviyelerinin, kalp yetmezliği olan hastalarda mortalite sebebi olarak sayılan vasküler disfonksiyonda bir belirteç olduğu raporlanmıştır (245, 246). CX3CR1 kemokin reseptörünün farmakolojik olarak baskılanmasıyla farelerde aterosklerozis insidansının azalması sonucu, M1 makrofaj fenotipinin yoğunlukta bulunduğu bilinen ateroskleroz hastalığının pro-inflamasyon durumunun bu şekilde baskılanıp hastalıkta iyileşme sağlanmıştır (247). Fakat, CX3CR1 kemokin reseptörünün aritmideki rolü incelendiğinde, literatürde herhangi bir konjenital kalp hastalığında bu kemokin reseptörü ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Biz bu tez çalışmasında, kardiyak makrofajların lokasyon ve yoğunluk analizini takiben, fare kalp dokularında makrofajların polaritesini incelemek amacıyla, literatürde atriyal fibrilasyon fare

modelinde M1 fenotipi için kullanılan (167) ve çalıştığını test ettiğimiz iNOS antikorlu ile kalp ve dalak dokularında immünboyama protokolü gerçekleştirdik. Vahşi tip ve *Casq2*^{-/-} farelerin dalak dokularında iNOS⁺ hücrelere rastlasak da, kalp dokularında iNOS proteini açısından immünreaktivite tespit edemedik. Ancak farklı antikorlar kullanılarak farklı M1 makrofaj fenotipi belirteçlerinin test edilmesiyle konjenital aritmi kalplerinde M1 makrofaj gözlenmemesi sonucu gelecek çalışmalarda doğrulanmalıdır. Özetle, literatürde M2 makrofaj fenotipi ile ilişkili olduğu ispatlanan CX3CR1 ifadelerinin bizim bulgularımızda sağlıklı farelerde hasta farelere oranla daha fazla yoğunluğa sahip olması, bu tez çalışmasında kullanılan vahşi tip farelerin *Casq2*^{-/-} farelere kıyasla anti-inflamatuvar M2 benzeri profil sergilediğini göstermiştir. Bununla birlikte, ileriki çalışmalarda konjenital aritmi hastalığı patogenezinde kardiyak makrofajların spesifik olarak polaritelerinin araştırılması gerekmektedir.

7.2 Olgunlaşmamış ve Matür Kardiyomiyositlerin Yeniden Ekim Protokollerinin Tanımlanmasında Enzim ve Matriks Seçimi

Bu tez çalışmasının hipotezi doğrultusunda ventriküler taşikardi transgenik fare soyu ile yürüttüğümüz çalışmalarla eş zamanlı olarak, sağlıklı ve konjenital aritmi hastalarından elde edilen uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH)-kökenli kardiyomiyositler ve monosit kökenli makrofajlardan kokültürler elde ettik. Bu kokültürlerde makrofajlar ile kardiyomiyositleri arasında etkileşimleri *in vitro* olarak çeşitli morfolojik, moleküler ve fonksiyonel analizlerle inceledik. Bu deneylerde kullanmak üzere öncelikle uPKH'lerinden kardiyak kültürler farklılaştırıldı. Kardiyomiyositler, matürasyon ilişkili gen ifadelerinin artması, sarkomerik yapıların oluşması, hücrelerin kasılmaları arasında sinsityum sağlanması ve hücreler arasında koneksin bağlantılarının oluşması ile olgunlaşmaktadır (28, 248). Kardiyomiyosit kültürlerinde 25. günden sonra artmış *MYH7* gen ifadeleri ve 30. günde hücreler arasında pozitif gözlenen bağlantı proteini CX43 için immünboyamalar doğrultusunda, deneylerimizde 30-45. günler arasındaki olgun kardiyak kültürlerden faydalandık. Bununla birlikte, kardiyak kültürlerin olgunlaşmamış ve matür günlerindeki hücreler için literatürde ilk defa detaylı bir şekilde tanımlanmış yeniden ekim protokolleri oluşturduk ve bulgularımızı yayınladık (18, 249). Bu protokollerin

sonucunda uygun kombinasyonda olan enzim ve matriks çeşitlerini, kokültürleri oluştururken hem kardiyomiyositler hem makrofaj hücreleri için kullandık ve bu şekilde canlılığı yüksek, uzun süreli idame edebildiğimiz kültürler elde ettik.

Bu tez çalışmasında, farklılaştırdığımız kardiyomiyositlerin, sağlıklı veya hasta bireyin kalp fonksiyonlarına benzer moleküler, fonksiyonel ve elektrofizyolojik fenotip sergilediğini tespit ettik (18, 19). Hasta ve sağlıklı bireylerden elde ettiğimiz kardiyomiyosit kültürleri arasında kardiyak spesifik gen ve protein ifadeleri açısından farklılık tespit edilmedi. *Ryanodin reseptör 2* geninde tespit edilmiş bir fonksiyon kazanımı mutasyonu taşıyan ventriküler taşikardi fare modelinde atriyum dokularında azalmış *SCN5A* ifadeleri tespit edilmesine (250) rağmen, literatürde *SCN5A* geni fonksiyon kazanımı mutasyonları sonucu kontrol ve aritmi hastası karşılaştırmasını içeren bir çalışma mevcut değildir. Bu tez çalışmasında, sağlıklı ve *SCN5A*^{F1465L/+} mutasyonlu hasta kökenli kardiyomiyositler arasında *SCN5A* mRNA seviyelerini karşılaştırdığımızda, hasta grubunda gen ifadelerinin sağlıklı gruba oranla arttığı tespit edilse de bu artışın istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamasının sebebi, örneklem sayısının az olması veya kültürler arası yüksek varyasyon kaynaklı olabilir.

Hasta grubu kardiyomiyositleri *SCN5A*^{F1465L/+} mutasyonu taşıyan hastanın laboratuvarımızda üretilen uPKH'lerinden farklılaştırıldı. Bu hastaya pandemi koşullarında ulaşma zorluğundan dolayı kokültürlerde kullanacağımız hasta kökenli makrofaj kültürlerini, *SCN5A* genindeki p.F1465L mutasyonu ile aynı bölgede lokalize olan p.1505-1507delKPQ mutasyonuna sahip UQTS-3/Brugada sendromu fenotipi gösteren hastadan elde ettik. Her iki mutasyon da fonksiyon kazanımı (gain-of-function) çeşidinde olduğu için *SCN5A*^{F1465L/+} ve *SCN5A*^{delKPQ/+} mutasyonlu hücreler bu çalışmaya benzer fenotip göstermeleri beklenerek dahil edildi (57, 58).

7.3 Moleküler Açıdan Sağlıklı Birey Kökenli Makrofajların M2 Fenotipi, Hasta Birey Kökenli Monositlerin M1 Fenotipi Sergilemesi

Kardiyak kültürlerin farklılaşmasını takiben, sağlıklı bireyler ve UQTS-3 hastasından, monosit kökenli naiv M0 makrofaj kültürleri elde ettik. İlk etapta, makrofaj kültürlerini morfolojik olarak incelediğimizde sağlıklı ve hasta bireyden köken alması farketmeksizin kültürlerde benzer morfolojiler gözlemledik. Fakat

kültürlerin 15. günden sonraki ileri günlerinde ortamda bir uyarıcı faktör olmadığı takdirde makrofajlar, monosit hücrelerine dediferansiyasyon (dedifferentiation) sergiledi. Literatürde M1 veya M2 fenotipine polarize olmuş makrofajların besiyerine stimüle edici bir faktör eklenmediğinde M0 naiv fenotipe dönüştüğü raporlanmasına karşın (130), bizim kültürlerimizdeki naiv makrofajların monosit hücrelerine dediferansiyasyonu bu tez çalışmasına özgü bir bulgudur.

Makrofaj kültürlerinin fagositoz ve akım sitometrisi analizleriyle karakterizasyonlarını incelediğimizde ise, hasta ve sağlıklı gruplar arasında bir analize alınan belirteçler açısından farklılık tespit etmedik. Bu incelemelerin ardından, M0 / M1 / M2 makrofaj fenotiplerine özgü gen ve protein ifadeleri araştırıldığı kantitatif RT-PZR ve immünboyama analizlerine geçildi. Literatürde M1 / M2 fenotiplerine sahip kardiyak makrofajların regülatör rolleri genellikle hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Makrofajların kardiyak patofizyolojisi ile ilişkisinin araştırıldığı bu hastalıklar; MI, atriyal fibrilasyon, ateroskleroz ve enfeksiyöz/inflamatuvar kalp hastalıklarıdır (10, 167, 224, 251–253). Deneysel MI modeli oluşturulan fare kökenli bir çalışmada, hasarlı dokuda dolaşımdan hasarlı bölgeye göç eden M1 fenotipli pro-inflamatuvar makrofajlar tespit edilmiştir (116). MI modelinde fare kalplerindeki makrofaj polaritelerinin çalışıldığı başka bir çalışmada ise, M1 / M2 makrofaj yoğunluğunun hasar sonrası 3. günde %76 / 24, 7. günde %8 / 55 oranında olduğu raporlanmıştır (161). Kemirgen modelinde atriyal fibrilasyon hastalık patogenezi ile kardiyak makrofajların ilişkisinin çalışıldığı bir kokültür tabanlı araştırmada, M1 makrofajların yoğunlukla pro-inflamatuvar IL-1 β sitokini salgılayarak, kalp kasılmasında görevli *CACNA1C* (kalsiyum voltaj-kapılı kanal alfa 1C alt birimi) gen ve protein ifadelerini baskıladığını belirtmiştir (167). Bu kardiyak iyon kanalı ifadesinin azalmasıyla kalbin aksiyon potansiyelini başlatmada görevli kalsiyum iyonlarının kanaldan geçerken akımlarında düşüş olmakta ve bu durum atriyal fibrilasyon gelişmesine neden olabilmektedir. Bu çalışma atriyal fibrilasyon patogenezinde kardiyak makrofajların doğrudan rolünü kanıtlamakla birlikte, oluşturulan kokültür sistemlerinde fiziksel etkileşimler araştırılmamıştır (167). Bununla birlikte, sağlıklı kalpte yer alan kardiyak makrofajların gen ifade fenotipinin M2 yönünde olduğu da raporlanmıştır (14). Tüm bu çalışmalar göstermiştir ki kardiyak makrofajların polarizasyonu, ritim bozukluğuna yol açabilecek kardiyak hasar

durumlarında M2 anti-inflamatuvar tipten M1 fenotipine dönüşmektedir. Fakat, literatürde daha önce ne insan hücreleri ne de fare modellerinde konjenital aritmi hastalığında kardiyak makrofajların polarizasyonları incelenmemiştir. Bu doğrultuda yürütülen makrofaj kültürlerinin mRNA ifade analizleri sonucunda M1 ve M2 fenotipi açısından gruplar arasında bazı moleküler farklılıklara rastladık. Sağlıklı bireylerden farklılaştırılan makrofajlar *CD206* ve *IL-10* gibi temel M2 fenotipi belirteç genlerini hasta kökenli makrofajlara oranla yüksek miktarda ifade ettiği için, sağlıklı grup makrofajlarını M2 fenotipine hasta kökenli makrofajlardan daha yakın bir popülasyon olarak gözlemledik. Bununla birlikte, *IL-1B* ve *CD86* genlerini yüksek düzeyde ifade eden konjenital aritmi hastalarından izole edilen monositlerin pro-inflamatuvar M1 tipinde polarizasyon sergilediğini tespit ettik. Analiz edilen tüm makrofaj kültürlerinden RNA örnekleri, kültürlerin aynı günlerinde izole edilmesine rağmen, örnekler arasında gen ifade seviyeleri açısından yüksek varyasyon gözlemledik. Bunun sebebi, makrofajların kolaylıkla polarize olan ve stabil olmayan hücreler olması doğrultusunda, kültür koşullarında ortaya çıkan değişimlerden etkilenecek gen ifadelerinde hızlı bir şekilde değişiklikler meydana gelmesi olabilir. Bu doğrultuda, ileriki çalışmalarda örneklem sayısı artırılarak deneyler arası varyasyon oranları düşürülebilir.

Gen ifade analizleri ile eş zamanlı yürütülen protein boyamalarında, sağlıklı veya hasta makrofaj kültürlerinde CXCL10 ve iNOS pozitif hücre gözlemlemedik. Sağlıklı makrofaj kültüründe tüm hücreler M2 makrofaj spesifik protein CD206 mannoz reseptörü açısından immünreaktif olarak gözlenirken, hasta grubu makrofajlarda reaktivite daha az tespit edildi. İmmünboyama ve gen ifade analizlerimiz sonucuna göre, CD206 açısından sağlıklı makrofajların hasta makrofajlardan M2 fenotipine daha yakın olduğunu, literatür ile uyumlu olarak tespit ettik (125, 219). Biz bu tez çalışmasında, sağlıklı makrofaj kültürlerinde genel anlamda M0 ve M2 fenotipinin moleküler temelini oluşturan genlerin mRNA düzeylerinde artış gözlemlese de konjenital aritmi kökenli makrofajlarda tam anlamıyla M1 veya M2 fenotip spesifik bir eğilim tespit edemedik. Kantitatif PZR yöntemi ile konjenital aritmi patogeneze özel bir belirteç yakalamak, M2 makrofajlar aralarında M2a, M2b, M2c ve M2d gibi çeşitli fenotiplere sahip oldukları için zordu. Bununla birlikte, literatürde son zamanlarda ateroskleroz patogenezinde tanımlanan ve köpük hücre

makrofajlarına özgü olduğu belirtilen pro-inflamatuvar özellik gösteren M4 fenotipli makrofajların, M0 makrofajlara benzer olarak CD45, CD14 ve CD68 genlerini yüksek oranda ifade ettiği gösterilmiştir (103, 140). Sonuç olarak, konjenital aritmi modeli fare ve insan kökenli makrofajlarda kullandığımız M1 belirteçleri açısından pozitiflik gözlenmemesi sonucu, bu hastalığa ait makrofaj hücrelerinde farklı iNOS işaretleyici antikolar kullanılarak veya farklı M1 fenotipi alt popülasyonlarının değerlendirilmesi olasılığını doğurmuştur. İleriki çalışmalarda konjenital aritmi hastalarından elde edilecek makrofajların, transkriptom veya proteom analizlerinden faydalanılarak kapsamlı moleküler fenotipik araştırmalar yapılması tanımlayıcı olabilir.

Sağlıklı ve *SCN5A* gen mutasyonu taşıyan konjenital aritmi kökenli kardiyomiyosit ve makrofaj kültürlerinin fonksiyonel ve moleküler karakterizasyon analizleri tamamlandıktan sonra, bu iki hücre tipini içeren *in vitro* kokültür sistemlerini oluşturduk. Kardiyak immünoloji konulu kokültür çalışmaları literatürde sınırlı sayıda olmakla birlikte, bu çalışmaların çoğunluğu hücre besiyerlerini kullanarak kokültür çalışmaları yapan ve kemirgen soyları üzerine olan araştırmalardır (167–169, 220). İnsan kökenli kardiyak hücreler ile makrofajları birleştiren *in vitro* kokültür modeli literatürde sadece SARS-CoV-2 hastalığında yürütülmüş olup bu çalışmada, bizim çalışmamızın temel noktasını oluşturan immünoelektrofizyolojik değişimler araştırılmamıştır (169). Literatürde aynı zamanda bizim kullandığımız gibi insan kökenli kardiyomiyosit ve makrofaj hücreleri ile yürütülmüş, hücreler arası bağlantı profillerini içeren bir kokültür çalışması olmamasından dolayı çalışmamızda optimizasyon deneyleri ile tekrar edilebilir ve uygulanabilir bir kokültür protokolü oluşturduk. Bu aşamadan sonra, sağlıklı ve hasta kökenli kardiyomiyosit ve makrofajların çeşitli kombinasyonlarını içeren kokültür grupları oluşturduk. Kokültür grupları arasında hücresel anlamda morfolojik bir farklılık tespit edilmezken, kokültürdeki makrofajların tekli makrofaj kültürlerindeki gibi monosite geri farklılaşması (dediferansiyasyon) gözlemlendi. Bu sebeple, kültür süresi iki haftanın üzerine çıkmadan tüm gruplarda analizler, 7-14. günler arasında gerçekleştirildi.

Oluşturduğumuz kokültür sisteminde temel olarak, makrofajların uPKH-temelli kardiyomiyositler üzerindeki ritmi üzerine etkisinin incelenmesi amaçlandı. Bu doğrultuda, hücrelerin doğrudan birbirleriyle temas kurduğu bölgeler analize alındı ve hücreler arasındaki etkileşimler moleküler ve fonksiyonel olarak araştırıldı. Öncelikle,

kokültürde WGA canlı immünboyamaları yapıldı, kardiyomiyositler ve makrofajların membranları vasıtasıyla fiziksel bağlantı kurdukları tespit edildi. Önemli olarak, membran teması kurmamış bölgelerde, makrofajların membran uzantılarıyla (protrusion) kardiyomiyositlere doğru yönlendiğini gözlemledik. Bu iki insan kökenli hücre tipi arasındaki membran etkileşimleri literatürde *in vitro* kültür sistemlerinde daha önce gösterilmemiştir.

Hücreler arası iyon, ikincil mesajcılar ve küçük sinyal moleküllerin geçişinde görevli olan koneksinler, kardiyak aritmi patogeneğinde önemli bir parameter olarak literatürde yerini almıştır (47). Kardiyak hastalıklarda ortaya çıkan azalmış CX43 ifadesi genellikle kalpte elektriksel iletimin bozulması ve aritmilerle ilişkilendirilmiştir (254). CX43 proteinin protein kinaz C tarafından düzenlenmesi sürecinde oluşan hatalar kardiyak iskemilerde sıkça gözlenmektedir (255). CX43 proteinin SA nod ve AV nod gibi elektriksel ileti merkezlerinde ifade edilmediği, literatürde kabul edilmiş bir bilgi olmasına rağmen 2017 yılında yapılmış bir çalışma, fare AV nod kardiyomiyositleri ile kardiyak makrofajların birbirlerine Cx43 proteinleri ile bağlanarak bu şekilde kalbin aksiyon potansiyelinin düzenlendiği gösterilmiştir (9). Kardiyak ileti sistemi anormalliklerini ve dolayısıyla kardiyak ritim bozukluklarının gelişimini, iyon kanalları kadar koneksin protein genlerindeki mutasyonların da etkilediği raporlanmıştır (256, 257). Koneksin 43 proteininin yanı sıra, kardiyomiyosit spesifik CX40 proteininin azalmış ifadeleri, *SCN5A* gen varyantı sonucu oluşan atriyal aritmi hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (56). Koneksinlerin ötesinde dezmozom bağlantılarının bozulması da aritmi türlerine sebep olabilmektedir (258). Kardiyak sodyum iyon kanalı $Na_v1.5$ ile fiziksel temasta bulunarak işlev gören Desmoglein-2 bağlantılarının azalmasının, hücrede CX43 kanallarının anormal dağılımını tetiklediği böylece iyon geçişindeki problem kaynaklı aritmojenik sağ ventrikül kardiyomiyopatisi olduğu gösterilmiştir (56). MI sonrası fare modellerinde, ilk üç günde hasar bölgesinde sayısı artmış pro-inflamatuvar tipte makrofajların kardiyomiyositlerle koneksinler vasıtasıyla bağlantı oluşturduğu gözlenmiştir (259). Bununla birlikte, makrofajların koneksinler yoluyla bağlandığı kardiyomiyositlerin aksiyon potansiyel sürelerini kısalttığı ve böylelikle kardiyak atımın hızlandığı gösterilmiştir (9, 259). Tüm bu çalışmaların ışığında, kokültürlerdeki kardiyomiyosit ve makrofaj hücreleri arasında kurulan membran bağlantıları, canlı WGA membran

boyaması ile doğrulanırken bağlantılar CX43 proteini varlığı açısından da incelendi. İmmünboyamalarımız sonucunda, kardiyomiyositler arasında ve hatta kardiyomiyositler ile kardiyak kültüre ait diğer hücreler arasında CX43 proteini pozitif gözlenirken, tekli makrofaj kültürlerinde ve kokültürlerdeki kardiyomiyosit ve makrofaj membran bağlantılarında CX43 protein ifadelerine rastlamadık. İlginç olarak, CX43 proteini kokültürlerde tekli kültürlerdeki gibi sadece kardiyomiyosit hücreleri arasında pozitif boyanmaya devam etti. Bu sonuç bize fare ve insan kalbinde *in vivo* olarak varlığı gösterilen bu bağlantı proteininin, olgunlaşmış hücrelerin yapısında bulunabileceğini düşündürdü. Çünkü kardiyomiyositler ve makrofajlar arasında CX43 proteini pozitif gözlenen çalışmalarda kemirgenlerin kalp dokularından elde edilmiş *ex vivo* kardiyomiyositler kullanılmıştır (9, 259). Fakat, bu tez çalışmasında kullanılan hücreler insandan elde edilen pluripotent kökenli *in vitro* hücre kültürü kökenliydi, bu sebeple kardiyomiyosit ve makrofajlar arası diğer tipte koneksin proteinleri veya farklı bağlantı proteinlerinin varlığı ileriki çalışmalarla araştırılmalıdır. Örneğin, kardiyomiyosit ve makrofaj tek hücre bağlantılarının moleküler karakterizasyonu tek hücreli gen sekanslama çalışmaları ile gelecekte yapılabilir. Dahası, iki hücre tipi arasında koneksin gibi bağlantı proteinlerinin oluşması için insan kökenli kokültürlerin süresi uzatılarak ileri seviyede optimizasyon çalışmaları ile hücrelerin olgunlaşması sağlanabilir.

Sağlıklı insan kalp dokularından elde edilen kardiyak adipoz doku kökenli mezenkimal hücreler ile monosit kökenli insan makrofajlarının kokültürlerinde, makrofaj polarizasyonlarının morfolojik ve gen ifadesi açısından M2 fenotipine yakın olduğu ortaya konmuştur (221). Atrial fibrilasyon hastalık modeli fare kokültürlerindeki makrofajların ise, M1 pro-inflamatuvar polarizasyonuna sahip olması ve iyon kanalı ifadelerini bozarak geçen akımı azaltıp kalp ritim bozukluğuna sebep olduğu gösterilmiştir (167). Bu bulguların dışında, insan kardiyak biyopsilerden elde edilen hücreler ve makrofajların, besiyeri uygulanması şeklinde oluşturulmuş *in vitro* kokültüründe, makrofajların M1 veya M2 olmayan farklı bir yöne doğru polarize olduğu raporlanmıştır (224, 260). Bu sebeple kokültürlerimizi, immünboyamaların yanı sıra kantitatif RT-PZR yöntemi ile M1 ve M2 fenotip spesifik genler açısından değerlendirdik. Kokültürlerde makrofajların zamanla sayılarının değişmesini gözlemlememiz doğrultusunda, gruplar arasında hücre oranları açısından farklılık

oluştduğundan dolayı kültürlerin gen ifadelerini kantitatif olarak karşılaştırmada güçlük çektik. Buna rağmen, bu tez çalışmasının grup 1 sağlıklı kokültürlerinde *IL-10* geninin monositlere oranla artmış gen ifadeleri sonucu sağlıklı hücre kökenli kokültürlerin M2 benzeri fenotip sergilediği tespit edildi. Bununla birlikte, grup 4 hasta kökenli kokültürlerde hasta kökenli monositlere kıyasla M1 makrofaj fenotipi belirteci pro-inflamatuvar *TBET* geninin artmış ifadeleri belirlendi. Bu sonuç bize grup 1 sağlıklı ve grup 4 hasta kökenli kokültürlerin, köken aldıkları bireylerin fizyolojik özelliklerini sırasıyla anti-inflamatuvar ve pro-inflamatuvar profil sergileyerek yansıtabildiğini, bu şekilde sağlıklı ve hastalık durumlarını kokültür modellerinde *in vitro* olarak modelleyebileceğimizi gösterdi. Ayrıca gelecek çalışmalarda, kokültürlerdeki kardiyak makrofajların, tekli hücre ayrıştırma yöntemleri ile izole edilmeleri ardından transkriptom analizleri ile spesifik makrofaj polariteleri açısından genetik karakterizasyonlarının yapılması gerekmektedir.

7.4 Sağlıklı Makrofajların Aritmi Fenotipi Gösteren Hasta Kökenli Kardiyomiyositlerin Atım Frekansını Düşürmesi ve Ritmini Düzenlemesi

Hulsmans ve arkadaşlarının çalışmasında (9), fare kökenli kardiyak makrofajların sağlıklı durumda kardiyomiyositlerin aksiyon potansiyel süresini kısaltıp, kasılmalarını hızlandırdığı gösterilmiştir (9, 158). Ters olarak ise, kardiyomiyositlerle bağlantılı olan makrofajların azalmasıyla ritmik atımın bozulması söz konusudur. Bununla birlikte aynı çalışmada, insan ve fare kalp kesitlerinde yapılan histolojik ve anatomik immünboyamalar göstermiştir ki kardiyak makrofajların yoğunlukla lokalize olduğu yer, kalp kasılmasının elektriksel sinyallerinin iletildiği ve dağıtıldığı AV nod bölgesidir (9). Bu nedenle kasılma sinyallerinin iletildiği bölgede yer alan kardiyak makrofajlar kendilerine gelen sinyal aritmik olsa da immünoelektrofizyolojik düzenleme rolü ile ventriküllerin ritmik kasılmasına katkıda bulunurlar (9, 158). Bu tez çalışmasında kokültürlerdeki makrofaj bağlantısı kuran kardiyomiyositlerin fonksiyonel kasılma analizleri, MUSCLEMOTION isimli kasılma analizi (89) ve hücre içi Ca^{2+} görüntüleme ile yapılmıştır (220). Kalsiyum iyonu, Ca^{2+} kanallarının yanı sıra koneksinler vasıtasıyla da kardiyak hücreler arasında taşınarak kardiyomiyositlerin domino etkisi ile senkronize kasılmasında rol

oynamaktadır (261). Aynı zamanda makrofaj membranında da bulunan Ca^{2+} kanalları ile hücre içine giren Ca^{2+} iyonu, fagozomal oksidatif reaksiyonlarda ve inflamatuvar sitokin üretimi süreçlerinde görevlidir (262). Biz bu tez çalışmasının hücre içi Ca^{2+} görüntüleme analizinde, tekli kardiyomiyosit kültürlerinde hücre içi Ca^{2+} aktivitesini hastalık fenotipi ile paralel olarak değişimlerini gözlemlerken, tekli makrofaj kültürlerinde spontan bir Ca^{2+} aktivitesi tespit etmedik. Fakat kokültürlerde kardiyomiyositlere yapışık halde bulunan makrofajlarda, hücre içi Ca^{2+} aktivitesinde floresan değişimler saptadık. Bu değişimler kardiyomiyositlerin genotip karakterleri ile uyumlu olarak ritmik veya aritmik şekilde gözlemlendi. Bu iki hücre arasında yürütülen Ca^{2+} aktivitesi bazlı korelasyon analizi sonucu, kokültür gruplarında kardiyomiyosit ve makrofajlar arasında minimum %30, maksimum %78 oranlarında korele Ca^{2+} iyonu geçişi tespit ettik. Bu durum bize iki hücre tipi arasında Ca^{2+} iyonu geçişini sağlayan membran temelli bağlantıların kokültürlerde kurulduğunu göstermektedir. Bu bağlantıların CX43 içermediğini tespit etsek de, ileride yapılacak tek hücreli gen sekanslama çalışmalarıyla farklı bağlantı proteinlerinin araştırılması gerekmektedir.

Kardiyomiyosit ve makrofaj hücreler arası Ca^{2+} görüntüleme analizinde spontan iyonik aktivitenin gözlenmesinden sonra, tekli kültürler ve kokültürlerde MUSCLEMOTION kasılma analizlerini gerçekleştirdik. Ventriküler taşikardi hasta kökenli kardiyomiyositler, sağlıklı kardiyomiyositlere oranla bireylerin EKG verilerine uygun ve anlamlı şekilde hızlanmış BPM sayısına sahiptir ($P<0,0001$). Hasta kökenli kardiyomiyositlerde gözlemlenen hızlı atım profili, aynı hücrelerden alınan Ca^{+2} sinyalleri ile benzer bir patern gösterdi. Fonksiyonel kasılma analizlerimiz, literatürde UQTS-1 ve UQTS-2 hastalık kökenli uPKH-temelli kardiyomiyositlerle yapılan yama kısıncı ve kalsiyum görüntüleme analizleri ile tutarlılık sergilemektedir (263, 264). Bu sonuçlar, uPKH-kökenli kardiyomiyositlerin köken aldığı hastanın klinik fenotipini *in vitro* olarak modelleyebildiğimizi doğrulamıştır.

Tekli kardiyomiyosit kültürlerinin fonksiyonel kasılma analizlerinden sonra, kokültürlerdeki makrofaj bağlantılı kardiyomiyositlerin kasılma analizleri yürütüldü. Sağlıklı kardiyomiyositler ile sağlıklı veya hasta kaynaklı olması farketmeksizin ekilen makrofajların olduğu kokültürlerde, kardiyak hücrelerin atım frekansında anlamlı şekilde artış tespit edildi. Diğer bir deyişle, grup 1 sağlıklı kokültürlerdeki makrofajların kardiyomiyositlerin kasılma kinetiklerini, literatürdeki çalışmayla

benzer olarak hızlandırdığını belirledik (9). Bununla birlikte, aritmik ve taşikardik özellikte kardiyomiyositler ile ekilen sağlıklı makrofajların oluşturduğu grup 3 kokültürlerde, hasta kökenli kardiyomiyositlerin atım frekansının istatistiksel anlamlı olarak azaldığını tespit ettik. Bu sonuç, çalışmamızın en önemli ve özgün bulgularından biri olmakla birlikte, sağlıklı bireyden elde edilen makrofajların aritmi kökenli kardiyomiyositlerin kasılma eğrilerini ritmik ve düzenli atım profillerine dönüştürdüğünü göstermiştir. Her iki hücre tipinin de hasta kökenli olarak ekildiği grup 4 kokültürlerde herhangi bir ritim düzenleyici veya kasılma frekansı değiştirici etki saptamadık. Bu kokültür grubu, köken aldığı hasta bireylerin sergilediği konjenital aritmi hastalığını kültür ortamında *in vitro* olarak modelleyebildiğimizi bir kez daha göstermiştir.

Literatürde fare kardiyak makrofajların kardiyomiyositlerin atım profillerini düzenlediğini gösteren Hulsmans ve arkadaşlarının çalışmasında, bu düzenlenmenin mekanizmasında yer alan hücreler arası bağlantıların sayılarının artmasıyla da kasılma frekansının hızlandığı gösterilmiştir (9). Makrofaj bağlantısı olmayan kardiyomiyositlerde membran potansiyeli ölçüldüğünde, kardiyomiyositin kasılıp gevşeme süresi makrofajla bağlantısı olan gruba göre daha uzun olarak gözlenmiş ve dolayısıyla daha düşük kasılma frekansına sahip oldukları tespit edilmiştir (9). Bu sebeple biz bu tez çalışmasında, tüm kokültür gruplarını, alt gruplara ayırarak fonksiyonel kasılma analizlerimizi tekrarladık. Kokültür alt gruplarında bir veya birden fazla kardiyomiyosit ve makrofaj hücre bağlantılarının olduğu bölgeler seçilip detaylı bir kasılma analizi yürütüldü ve sonuç olarak literatür bulgusu ve total kasılma analizleri ile benzer şekilde, grup 1 ve 2 kokültürlerde sağlıklı kardiyomiyositler ile bağlantı kuran makrofajların sayısı arttıkça atım frekanslarının arttığı gözlemlendi (9). İlginç olarak, grup 3 kokültürlerde aritmik kardiyomiyositlere bağlanan sağlıklı makrofajların sayısı arttıkça, atım frekanslarının istatistiksel anlamlı olarak total kasılma analizleri ile benzer şekilde azaldığı tespit edildi. Bununla birlikte, makrofajların temas kurduğu kardiyomiyositlerin kasılma ritimlerindeki sebep olduğu değişiklikleri incelemek için yürütülen ritim analizleri sonucunda, sağlıklı makrofajların taşiaritmi fenotipi gösteren hasta kökenli kardiyomiyositlerin aritmik aktivitesini iyileştirdiğini, *SCN5A* mutasyonuna sahip hasta kökenli makrofajların hem sağlıklı hem de hasta kökenli kardiyomiyositlerin kasılma ritmini önemli ölçüde

bozduğunu göstermiştir. Bu bulgularımız bu tez çalışmasında ulaştığımız önemli ve özgün verilerdir.

İnflamasyon bölgesinde fibrozise sebep olan M1 tipte kardiyak makrofajların inhibe edilmesiyle MI sonrası iyileşme sağlayan bir çalışmada, bölgedeki makrofajların M2 fenotipine doğru polarize olarak nöral büyüme faktörünü indüklediği, sempatik hiperinervasyonu arttırdığı ve hasarlı bölgenin sinir ağları ile sarılmasıyla ventriküler taşiaritminin insidansını azalttığı raporlanmıştır (265). Kemik iliği mononükleer hücrelerin M-CSF ve IL-4 ile muamelesi sonrası farklılaşan M2 benzeri makrofajların ise MI sonrası aritmik fare kalplerine hücresel tedavi ile büyük oranda iyileşme tespit edilmiştir (224). Kardiyak hastalıklarda yapılan hücresel tedavi çalışmaları genellikle kök hücre temelli kardiyak hücre tiplerini kapsamaktadır fakat konjenital ritim bozukluklarında şuna kadar yürütülmüş makrofaj kökenli hücresel tedavi çalışması bulunmamaktadır. Tüm verilerimizin ışığında, ileride yapılacak kontrollü çalışmalarda sağlıklı makrofajların kullanılmasıyla kardiyak fonksiyonların düzeltilmesi ve organda iyileşme sağlanması mümkün olabilir. Bulgularımız bu yönleriyle aritmi patogenezinin araştırılması ve tedaviye klinik katkı sağlama potansiyeline sahiptir. Bu nedenle bu tez çalışmasının, insan temelli makrofaj ve kardiyomiyositlerden oluşturulan kokültürlerdeki optimizasyon çalışmaları ve bu kokültürlerde hücrelerin moleküler ve fonksiyonel etkileşiminin incelenmesi yönleriyle özgün çıktıları bulunmaktadır.

Özetle, çalışmamızda sağlıklı ve *SCN5A* gen mutasyonu taşıyan konjenital aritmi tanılı hasta bireylere ait kardiyomiyosit ve makrofaj kültürleri morfolojik, moleküler ve fonksiyonel açıdan literatürde ilk defa analiz edildi. Transgenik fare modeli ve insan kökenli hücreler ile yürüttüğümüz tez çalışmasında, sağlıklı insan makrofaj kültürlerinde *CD206* ve *IL-10* gen ifadelerinin, sağlıklı fare kardiyak doku makrofajlarında ise *CX3CR1* protein ifadelerinin anlamlı olarak artış göstermesi, sağlıklı durumda makrofajların M2 benzeri fenotip sergilediğini gösterdi. Konjenital aritmi fenotipi gösteren hasta kökenli monositlerin artmış *IL-1B* ve *CD86* gen ifadeleri ile M1 benzeri fenotip sergilediği tespit edildi. Literatürde fare modellerinde *CX43* ile bağlantı kurduğu gösterilen kardiyomiyosit ve makrofajların, insan kökenli kokültürlerinde bu bağlantı proteini tespit edilemedi. Kardiyomiyosit ve makrofaj hücreleri arasında hücresel bağlantıların kurulduğu, canlı WGA membran boyaması

ve hücre içi spontan Ca^{2+} iyonik aktivite ile doğrulandı. Önemli olarak, sağlıklı veya hasta kaynaklı olması farketmeksizin makrofajlar, bağlantı kurduğu sağlıklı kardiyomiyositlerin kasılma frekansını arttırdığı, sağlıklı makrofajların ise aritmik kardiyomiyositlerin kasılma frekansını azaltıp ritmini düzenlediği gösterildi. Sağlıklı makrofajların *in vitro* kültürlerde M2 fenotipi sergilemesi ve aritmik atımı iyileştirici rolü literatürle uyumlu gözlemlendi. Gelecekte kliniksel yaklaşım olarak, M2 fenotipine yönlendirilmiş sağlıklı profil sergileyen makrofajlar ile yapılacak hücresel tedavilerin, aritmik kardiyomiyositlerin atım profillerinde senkronizasyonu sağlayarak alternatif bir tedavi seçeneği olması mümkündür.



8. SONUÇ

Sağlıklı C57BL/6 fareler ve konjenital aritmi hastalık fenotipi gösteren transgenik fare soyunda *ex vivo* olarak araştırdığımız CX3CR1⁺ kardiyak makrofajların, çoğunlukla AV nod içerisinde ve çevresinde tespit edilmesi ve bu makrofajların yoğunluğunun sağlıklı kalplerde istatistiksel anlamlı olarak artmış olarak tespit edilmesi bu tez çalışmasında ulaştığımız yeni bir bulgudur. Tez çalışmamızda ayrıca *in vitro* olarak, sağlıklı ve konjenital ritim bozukluğuna sahip bireylerden üretilen kardiyomiyosit ve makrofajları tekli kültürlerde karakterize ettik. Hasta kökenli makrofajları farklılaştırdığımız primer monositlerin M1 makrofaj fenotipi sergilediğini gördük. Kardiyomiyosit ve makrofajlardan oluşan kokültürlerdeki hücreler arası etkileşimleri morfolojik, moleküler ve fonksiyonel olarak inceledik ve bu iki hücre tipinin membran temasıyla bağlantı kurduğunu tespit ettik. Önemli olarak, bireye özgü makrofaj ve kardiyomiyosit hücreleri arasındaki etkileşimi araştırdığımız *in vitro* kokültür platformunda M2 fenotipi sergileyen sağlıklı birey kökenli makrofajların konjenital aritmi hastası kökenli kardiyomiyositlerin bozuk ritim profillerini düzenleyerek taşikardi profilini iyileştirdiği gözlenmiştir. Çalışmamız, özgün verilerinin yanı sıra insan kökenli kardiyomiyosit ve makrofajları içeren kokültür koşullarını ilk defa tanımlamamız yönüyle de metodolojik bir özgünlük taşımaktadır. Bulgularımızın geliştirilmesi ile gelecekte konjenital aritmi hastalığı tedavisinde immün sistem elemanlarından ve makrofajları içeren manipülatif sistemlerden faydalanılması olasıdır. Hedef bölgeye uygulanan veya sistemik olarak kana verilen sağlıklı makrofaj alt tiplerini stimüle edici küçük moleküller veya hedef proteinlerin aktivitesini arttıracak ilaçlar ile aritmi tedavisinde başarı sağlanabilir. Yürütülen bu çalışma, makrofajların kardiyomiyositlerin ritim bozukluğunu düzenleyici etkisinin incelenmesi için değerli bir model olarak yenilikçi bilgiler sunmuştur.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK 1003 - 213S192 nolu proje ve TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı tarafından 218S841 nolu projeler kapsamında desteklenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda kardiyomiyositlerin yeniden ekim protokollerinin tanımlandığı bir orijinal çalışma (18), bu protokolleri ayrıntılı bir şekilde betimleyen bir kitap bölümü (249) ve kardiyak immünoloji konulu bir derleme (163) yayınlanmıştır. Transgenik fare deneylerinde elde ettiğimiz bulguları içeren

makalemiz için hazırlık aşamasındayız. Bununla birlikte, konjenital aritmi hastası bireylerden üretilen kardiyomiyositleri karakterize eden (19) ve bu tez çalışmasının *in vitro* kokültür çalışmalarını kapsayan yayınlarımız değerlendirme aşamasındadır.



9. KAYNAKLAR

1. Schwartz PJ, Ackerman MJ, Antzelevitch C, Bezzina CR, Borggrefe M, Cuneo BF, Wilde AAM. Inherited cardiac arrhythmias. *Nature Reviews Disease Primers*. 6:1–49, 2020.
2. Zengin E, Sinning C, Blaum C, Blankenberg S, Rickers C, von Kodolitsch Y, Kirchhof P, Drury NE, Stoll VM. Heart failure in adults with congenital heart disease: a narrative review. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*. 11:529, 2021.
3. Iop L, Iliceto S, Civieri G, Tona F. Inherited and Acquired Rhythm Disturbances in Sick Sinus Syndrome, Brugada Syndrome, and Atrial Fibrillation: Lessons from Preclinical Modeling. *Cells*. 10:3175, 2021.
4. Han D, Tan H, Sun C, Li G. Dysfunctional Nav1.5 channels due to SCN5A mutations. *Experimental Biology and Medicine*. 243:852–863, 2018.
5. Lazzerini PE, Hamilton RM, Boutjdir M. Cardioimmunology: Inflammation and Immunity in Cardiovascular Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 6, 2019.
6. Baltogiannis GG, Lysitsas DN, di Giovanni G, Ciconte G, Sieira J, Conte G, Kolettis TM, Chierchia GB, de Asmundis C, Brugada P. CPVT: Arrhythmogenesis, Therapeutic Management, and Future Perspectives. A Brief Review of the Literature. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 6:8–11, 2019.
7. Pflaumer A, Davis AM. Guidelines for the diagnosis and management of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Heart Lung and Circulation*. 21: 96–100, 2012.
8. Márquez MF, Totomoch-Serra A, Rueda A, Avelino-Cruz JE, Gallegos-Cortez A. Basic and clinical insights in catecholaminergic (familial) polymorphic ventricular tachycardia. *Revista de Investigacion Clinica*. 71: 226–236, 2019.
9. Hulsmans M, Clauss S, Xiao L, Aguirre AD, King KR, Hanley A, et al. Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell*. 169: 510-522.e20, 2017.
10. Fei YD, Wang Q, Hou JW, Li W, Cai XX, Yang YL, Zhang LH, Wei ZX, Chen TZ, Wang YP, Li YG. Macrophages facilitate post myocardial infarction

- arrhythmias: Roles of gap junction and KCa3.1. *Theranostics*. 9: 6396–6411, 2019.
11. Gray GA, Toor IS, Castellan RFP, Crisan M, Meloni M. Resident cells of the myocardium: more than spectators in cardiac injury, repair and regeneration. *Current Opinion in Physiology*. 1: 46–51, 2018.
 12. Mylonas KJ, Jenkins SJ, Castellan RFP, Ruckerl D, McGregor K, Phythian-Adams AT, et al. The adult murine heart has a sparse, phagocytically active macrophage population that expands through monocyte recruitment and adopts an “M2” phenotype in response to Th2 immunologic challenge. *Immunobiology*. 220: 924–933, 2015.
 13. Pinto AR, Godwin JW, Rosenthal NA. Macrophages in cardiac homeostasis, injury responses and progenitor cell mobilisation. *Stem Cell Research*. 13: 705–714, 2014.
 14. Pinto AR, Paolicelli R, Salimova E, Gospocic J, Slonimsky E, Bilbao-Cortes D, Godwin JW, Rosenthal NA. An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile. *PLoS ONE*. 7, 2012.
 15. Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D’antoni ML, Debuque R, et al. Revisiting cardiac cellular composition. *Circulation Research* 118: 400–409, 2016.
 16. Funakoshi S, Yoshida Y. Recent progress of iPSC technology in cardiac diseases. *Archives of Toxicology*. 95: 3633–3650, 2021.
 17. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 131: 861–872, 2007.
 18. Koc A, Sahoglu Goktas S, Akgul Caglar T, Cagavi E. Defining optimal enzyme and matrix combination for replating of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes at different levels of maturity. *Experimental Cell Research*. 403: 112599, 2021.
 19. Goktas SS, Kazcı YE, Tuncay E, Torun T, Akdeniz C, Tuzcu V, Esra C. Functional Evaluation of the Tachycardia Patient-Derived iPSC

- Cardiomyocytes Carrying a Novel Pathogenic SCN5A Variant. *Journal of Cellular Physiology*. 2022.
20. Murry CE, Keller G. Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development. *Cell*. 132: 661–680, 2008.
 21. Iaizzo PA. Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices, third edition. E-ISBN 1-59259-835-8. doi: 10.1007/978-1-59259-835-9
 22. Sadler TW. Langman's medical embryology. 12th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, United States. 2012.
 23. Weinhausr AJ, Roberts KP. Anatomy of the Human Heart. <http://eknygos.lsmuni.lt/springer/675/51-79.pdf>. 2001.
 24. van Vliet P, Wu SM, Zaffran S, Puc  at M. Editor's choice: Early cardiac development: a view from stem cells to embryos. *Cardiovascular Research*. 96: 352, 2012.
 25. Sp  ater D, Abramczuk MK, Buac K, Zangi L, Stachel MW, Clarke J, Sahara M, Ludwig A, Chien KR. A HCN4+ cardiomyogenic progenitor derived from the first heart field and human pluripotent stem cells. *Nature Cell Biology*. 15: 1098–1106, 2013.
 26.   a  avi E, Ko   A,   aho  lu G  kta   S. The heart of the matter: Cardiac stem cells. *Turkish Journal of Biology* 40, 2016.
 27. Hoang P, Kowalczewski A, Sun S, Winston TS, Archilla AM, Lemus SM, et al. Engineering spatial-organized cardiac organoids for developmental toxicity testing. *Stem Cell Reports*. 16: 1228–1244, 2021.
 28. Guo Y, Pu WT. Cardiomyocyte maturation: New phase in development. *Circulation Research Lippincott Williams and Wilkins*: 1086–1106, 2020.
 29. Bruneau BG. Signaling and transcriptional networks in heart development and regeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, 2013.
 30. Cook MS, Weinhaus AJ. Anatomy of the thoracic wall, pulmonary cavities, and mediastinum. *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices*. 33-58, 2015.
 31. Litvi  ukov   M, Talavera-L  pez C, Maatz H, Reichart D, Worth CL, Lindberg EL, et al. Cells of the adult human heart. *Nature*. 588: 466–472, 2020.

32. Souza DS, Barreto T de O, Santana MNS, Menezes-Filho JER, Cruz JS, de Vasconcelos CML. Resident macrophages orchestrating heart rate. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 112: 588–591, 2019.
33. Passier R, Orlova V, Mummery C. Complex Tissue and Disease Modeling using hiPSCs. *Cell Stem Cell* 18: 309–321, 2016.
34. Lockhart M, Wirrig E, Phelps A, Wessels A. Extracellular Matrix and Heart Development Marie. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91: 535–550, 2011.
35. Belz GG, Breithaupt-Grogler K, Osowski U. Treatment of congestive heart failure--current status of use of digitoxin. *Eur J Clin Invest* 31 Suppl 2: 10–17, 2001.
36. Kurian T, Ambrosi C, Hucker W, Fedorov V v., Efimov IR. Anatomy and electrophysiology of the human AV node. *PACE - Pacing and Clinical Electrophysiology* 33 Blackwell Publishing Inc.: 754–762, 2010.
37. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198–205, 2002.
38. Ruan Y, Liu N, Priori SG. Sodium channel mutations and arrhythmias. *Nature Reviews Cardiology* 6: 337–348, 2009.
39. Varró A, Tomek J, Nagy N, Virág L, Passini E, Rodriguez B, Baczkó I. Cardiac transmembrane ion channels and action potentials: cellular physiology and arrhythmogenic behavior. *Physiol Rev* 101: 1083–1176, 2021.
40. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology- 12. Bask1. https://www.researchgate.net/publication/330486384_Guyton_and_Hall_Textbook_of_Medical_Physiology_-_12th-Ed. 2019
41. Dupre A, Vincent S, Iaizzo PA. Basic ECG Theory, Recordings, and Interpretation. *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices*. 191–201, 2005.
42. del Corso G, Verzicco R, Viola F. A fast computational model for the electrophysiology of the whole human heart. *Journal of Computational Physics* 457: 111084, 2022.
43. Kharche SR, Mudathir R, McIntyre CW. Electro-anatomical computational cardiology in humans and experimental animal models. *Translational Research in Anatomy* 26: 100162, 2022.

44. Brenda R, Howard W. Connexin Cell Communication Channels. Roles in the Immune System and Immunopathology 1st Edition, Kindle Edition. 978-1439862575. 2013.
45. Boyett MR, Inada S, Yoo S, Li AJ, Liu J, Tellez J, et al. Connexins in the sinoatrial and atrioventricular nodes. *Advances in Cardiology* 42: 175–197, 2006.
46. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 6th Edition, Garland Publishing, W.W. Norton & Company, New York. 2017.
47. Dbouk HA, Mroue RM, El-Sabban ME, Talhouk RS. Connexins: A myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *Cell Communication and Signaling* 7, 2009.
48. Bhattacharyya S, Duan J, Wang L, Li B, Bhakta M, Fernandez-Perez A, Hon GC, Munshi N V. Using Gjd3-CreEGFP mice to examine atrioventricular node morphology and composition. *Scientific Reports* 9: 1–15, 2019.
49. Desplantez T. Cardiac Cx43, Cx40 and Cx45 co-assembling: Involvement of connexins epitopes in formation of hemichannels and Gap junction channels. *BMC Cell Biology* 18: 1–13, 2017.
50. Temple IP, Inada S, Dobrzynski H, Boyett MR. Connexins and the atrioventricular node. *Heart Rhythm* 10: 297–304, 2013.
51. Yapıcı D, Azizoğlu M. Aritmiler ve Tedavisi. *Kalp ve Anestezi*: 389–402, 2015.
52. C. Wang S, Meng D, Yang H, Wang X, Jia S, Wang Y-F, Wang P. Pathological basis of cardiac arrhythmias: vicious cycle of immune-metabolic dysregulation. *Cardiovascular Disorders and Medicine* 3: 1–7, 2017.
53. Wleklinski MJ, Kannankeril PJ, Knollmann BC. Molecular and tissue mechanisms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Journal of Physiology* 598: 2817–2834, 2020.
54. Grant AO. Cardiac ion channels. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 2: 185–194, 2009.
55. Detta N, Frisso G, Salvatore F. The multi-faceted aspects of the complex cardiac Nav1.5 protein in membrane function and pathophysiology.

Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics 1854: 1502–1509, 2015.

56. Li W, Yin L, Shen C, Hu K, Ge J, Sun A. SCN5A variants: Association with cardiac disorders. *Frontiers in Physiology* 9: 1–13, 2018.
57. Keller DI, Acharfi S, Delacrétaz E, Benammar N, Rotter M, Pfammatter JP, Fressart V, Guicheney P, Chahine M. A novel mutation in SCN5A, delQKP 1507–1509, causing long QT syndrome: Role of Q1507 residue in sodium channel inactivation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35: 1513–1521, 2003.
58. Shi R, Zhang Y, Yang C, Huang C, Zhou X, Qiang H, Grace AA, Huang CLH, Ma A. The cardiac sodium channel mutation delQKP 1507-1509 is associated with the expanding phenotypic spectrum of LQT3, conduction disorder, dilated cardiomyopathy, and high incidence of youth sudden death. *Europace* 10: 1329–1335, 2008.
59. Lieve K v., van der werf C, Wilde AA. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation Journal* 80: 1285–1291, 2016.
60. Lieve K v., Verkerk AO, Podliesna S, van der Werf C, Tanck MW, Hofman N, van Bergen PF, Beekman L, Bezzina CR, Wilde AAM, Lodder EM. Gain-of-function mutation in SCN5A causes ventricular arrhythmias and early onset atrial fibrillation. *International Journal of Cardiology* 236: 187–193, 2017.
61. Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, Brugada R, Towbin JA, Nademanee K. Brugada syndrome: 1992–2002: A historical perspective. *J Am Coll Cardiol* 41: 1665–1671, 2003.
62. Knollmann BC, Chopra N, Hlaing T, Akin B, Yang T, Ettensohn K, et al. Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca²⁺ release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Journal of Clinical Investigation* 116: 2510–2520, 2006.
63. Rossi D, Gamberucci A, Pierantozzi E, Amato C, Migliore L, Sorrentino V. Calsequestrin, a key protein in striated muscle health and disease. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 2020.

64. Mohamed U, Napolitano C, Priori SG. Molecular and electrophysiological bases of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 18: 791–797, 2007.
65. Faggioni M, Kryshtal DO, Knollmann BC. Calsequestrin mutations and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Pediatric Cardiology* 33: 959–967, 2012.
66. Flores DJ, Duong TV, Brandenberger LO, Mitra A, Shirali A, Johnson JC, et al. Conditional ablation and conditional rescue models for Casq2 elucidate the role of development and of cell-type specific expression of Casq2 in the CPVT2 phenotype. *Human Molecular Genetics* 27: 1533–1544, 2018.
67. Laitinen PJ, Brown KM, Piippo K, Swan H, Devaney JM, Brahmabhatt B, et al. Mutations of the Cardiac Ryanodine Receptor (RyR2) Gene in Familial Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation* 103: 485–490, 2001.
68. Knollmann BC, Chopra N, Hlaing T, Akin B, Yang T, Ettensohn K, et al. Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca²⁺ release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Journal of Clinical Investigation* 116: 2510–2520, 2006.
69. Chopra N, Kannankeril PJ, Yang T, Hlaing T, Holinstat I, Ettensohn K, Pfeifer K, Akin B, Jones LR, Franzini-Armstrong C, Knollmann BC. Modest reductions of cardiac calsequestrin increase sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak independent of luminal Ca²⁺ and trigger ventricular arrhythmias in mice. *Circulation Research* 101: 617–626, 2007.
70. Landstrom AP, Dobrev D, Wehrens XHT. Calcium Signaling and Cardiac Arrhythmias. *Circulation Research* 120: 1969–1993, 2017.
71. Wleklinski MJ, Kannankeril PJ, Knollmann BC. Molecular and tissue mechanisms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. In: *Journal of Physiology*. Blackwell Publishing Ltd, 2817–2834. 2020
72. Napolitano C, Mazzanti A, Bloise R, et al. Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. 2004 [Updated 2022 Jun 23]. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022.

73. Haron-Khun S, Weisbrod D, Bueno H, Yadin D, Behar J, Peretz A, Binah O, Hochhauser E, Eldar M, Yaniv Y, Arad M, Attali B. SK 4 K + channels are therapeutic targets for the treatment of cardiac arrhythmias. *EMBO Molecular Medicine* 9: 415–429, 2017.
74. Mohamed U, Napolitano C, Priori SG. Molecular and electrophysiological bases of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 18: 791–797, 2007.
75. Sasaki K, Makiyama T, Yoshida Y, Wuriyanghai Y, Kamakura T, Nishiuchi S, et al. Patient-specific human induced pluripotent stem cell model assessed with electrical pacing validates S107 as a potential therapeutic agent for catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *PLoS ONE* 11: 1–17, 2016.
76. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663–676, 2006.
77. Liu Z, Wang L, Welch JD, Ma H, Zhou Y, Vaseghi HR, Yu S, Wall JB, Alimohamadi S, Zheng M, Yin C, Shen W, Prins JF, Liu J, Qian L. Single-cell transcriptomics reconstructs fate conversion from fibroblast to cardiomyocyte. *Nature* 551: 100–104, 2017.
78. Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, Sato Y, Amano N, Watanabe A, Goshima N, Yamanaka S. An Efficient Nonviral Method to Generate Integration-Free Human-Induced Pluripotent Stem Cells from Cord Blood and Peripheral Blood Cells. *STEM CELLS* 31: 458–466, 2013.
79. Karagiannis P, Takahashi K, Saito M, Yoshida Y, Okita K, Watanabe A, Inoue H, Yamashita JK, Todani M, Nakagawa M, Osawa M, Yashiro Y, Yamanaka S, Osafune K. Induced pluripotent stem cells and their use in human models of disease and development. *Physiological Reviews* 99: 79–114, 2019.
80. Oikonomopoulos A, Kitani T, Wu JC. Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as a Platform for Cell Therapy Applications: Progress and Hurdles for Clinical Translation. *Molecular Therapy* 26: 1624–1634, 2018.

81. Tanaka A, Yuasa S, Node K, Fukuda K. Cardiovascular disease modeling using patient-specific induced pluripotent stem cells. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 18894–18922, 2015.
82. Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, Hsiao C, Kamp TJ, Palecek SP. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nature Protocols* 8: 162–175, 2013.
83. Batalov I, Feinberg AW. Differentiation of Cardiomyocytes from Human Pluripotent Stem Cells Using Monolayer Culture. *Biomarker Insights* 10: 71, 2015.
84. Balafkan N, Mostafavi S, Schubert M, Siller R, Liang KX, Sullivan G, Bindoff LA. A method for differentiating human induced pluripotent stem cells toward functional cardiomyocytes in 96-well microplates. *Scientific Reports* 2020 10:1 10: 1–14, 2020.
85. Dempsey GT, Chaudhary KW, Atwater N, Nguyen C, Brown BS, McNeish JD, Cohen AE, Kralj JM. Cardiotoxicity screening with simultaneous optogenetic pacing, voltage imaging and calcium imaging. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 81: 240–250, 2016.
86. Liang P, Sallam K, Wu H, Li Y, Itzhaki I, Garg P, Zhang Y, Vermglinchan V, Lan F, Gu M, Gong T, Zhuge Y, He C, Ebert AD, Sanchez-Freire V, Churko J, Hu S, Sharma A, Lam CK, Scheinman MM, Bers DM, Wu JC. Patient-Specific and Genome-Edited Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes Elucidate Single-Cell Phenotype of Brugada Syndrome. *J Am Coll Cardiol* 68: 2086–2096, 2016.
87. Guatimosim S, Guatimosim C, Song LS. Imaging calcium sparks in cardiac myocytes. *Methods Mol Biol* 689: 205–214, 2011.
88. Ahola A, Pölönen RP, Aalto-Setälä K, Hyttinen J. Simultaneous Measurement of Contraction and Calcium Transients in Stem Cell Derived Cardiomyocytes. *Ann Biomed Eng* 46: 148–158, 2018.
89. Van Meer BJ, Sala L, Tertoolen LGJ, Smith GL, Burton FL, Mummery CL. Quantification of Muscle Contraction In Vitro and In Vivo Using

- MUSCLEMOTION Software: From Stem Cell-Derived Cardiomyocytes to Zebrafish and Human Hearts. *Curr Protoc Hum Genet* 99(1):e67, 2018.
90. Sala L, van Meer BJ, Tertoolen LGJ, Bakkers J, Bellin M, Davis RP, et al. MUSCLEMOTION: A versatile open software tool to quantify cardiomyocyte and cardiac muscle contraction in vitro and in vivo. *Circulation Research* 122: e5–e16, 2018.
 91. Fearnley CJ, Llewelyn Roderick H, Bootman MD. Calcium signaling in cardiac myocytes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, 2011.
 92. Andrysiak K, Stępniewski J, Dulak J. Human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, 3D cardiac structures, and heart-on-a-chip as tools for drug research. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2021 473:1061–1085, 2021.
 93. Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, Finsen A, Yndestad A, Aukrust P. Inflammatory cytokines in heart failure: Mediators and markers. *Cardiology (Switzerland)* 122: 23–35, 2012.
 94. Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, et al. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* 40: 91–104, 2014.
 95. Sager HB, Hulsmans M, Lavine KJ, Moreira MB, Heidt T, Courties G, et al. Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure. *Circulation Research* 119: 853–864, 2016.
 96. Budzianowski JK, Korybalska K, Bręborowicz A. The role of inflammation in cardiac arrhythmias pathophysiology. *Journal of Medical Science* 85: 197, 2016.
 97. Sordillo PP, Sordillo DC, Helson L. The prolonged QT interval: Role of pro-inflammatory cytokines, reactive oxygen species and the ceramide and sphingosine-1 phosphate pathways. *In Vivo* 29: 619–636, 2015.
 98. Lazzerini PE, Capecchi PL, Laghi-Pasini Franco. Long QT syndrome- an emerging role for inflammation and immunity. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2, 2015.

99. Abbas A, Litchman AH, Pillai S. Basic Immunology - 6th Edition. Elsevier Publishing group. ISBN: 0323549438. 2019.
100. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology - 10th Edition. Elsevier Publishing group. ISBN: 9780323757492. 2021.
101. Theret M, Mounier R, Rossi F. The origins and non-canonical functions of macrophages in development and regeneration. *Development (Cambridge)* 146:1–14, 2019.
102. Boyette LB, MacEdo C, Hadi K, Elinoff BD, Walters JT, Ramaswami B, Chalasani G, Taboas JM, Lakkis FG, Metes DiM. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS ONE* 12: 1–20, 2017.
103. Orekhov AN, Orekhova VA, Nikiforov NG, Myasoedova VA, Grechko A, Romanenko EB, Zhang D, Chistiakov DA. Monocyte differentiation and macrophage polarization. *Vessel Plus*, 2019.
104. Patel B, Ismahil MA, Hamid T, Bansal SS, Prabhu SD. Mononuclear phagocytes are dispensable for cardiac remodeling in established pressure-overload heart failure. *PLoS ONE* 12: 1–17, 2017.
105. Molawi K, Wolf Y, Kandalla PK, Favret J, Hagemeyer N, Frenzel K, et al. Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *Journal of Experimental Medicine* 211: 2151–2158, 2014.
106. Guillems M, Thierry GR, Bonnardel J, Bajenoff M. Establishment and Maintenance of the Macrophage Niche. *Immunity* 52: 434–451, 2020.
107. Svedberg FR, Guillems M. Cellular origin of human cardiac macrophage populations. *Nature Medicine* 24: 1091–1092, 2018.
108. Nahrendorf M, Swirski FK. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circulation Research* 112: 1624–1633, 2013.
109. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol* 33:643-75, 2015.
110. van de Laar L, Saelens W, de Prijs S, Martens L, Scott CL, van Isterdael G, et al. Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* 44: 755–768, 2016.

111. Leid J, Carrelha J, Boukarabila H, Epelman S, Jacobsen SEW, Lavine KJ, Peter. Primitive Embryonic Macrophages are Required for Coronary Development and Maturation HHS Public Access. *Circ Res* 118: 1498–1511, 2016.
112. Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology* 18: 733–744, 2018.
113. Lee M, Lee Y, Song J, Lee J, Chang SY. Tissue-specific role of CX3CR1 expressing immune cells and their relationships with human disease. *Immune Network* 18: 1–19, 2018.
114. Molawi K, Wolf Y, Kandalla PK, Favret J, Hagemeyer N, Frenzel K, et al. Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *Journal of Experimental Medicine* 211: 2151–2158, 2014.
115. Dutta P, Sager HB, Stengel KR, Naxerova K, Courties G, Saez B, et al. Myocardial infarction activates CCR2⁺ hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* 16: 477–487, 2015.
116. Heidt T, Courties G, Dutta P, Sager HB, Sebas M, Iwamoto Y, Sun Y, Da Silva N, Panizzi P, Van Der Lahn AM, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M. Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction. *Circulation Research* 115: 284–295, 2014.
117. Jackson M, Krasnodembskaya A. Analysis of Mitochondrial Transfer in Direct Co-cultures of Human Monocyte-derived Macrophages (MDM) and Mesenchymal Stem Cells (MSC). *Bio Protoc* 7, 2017.
118. Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology* 18 Nature Publishing Group: 733–744, 2018.
119. Bajpai G, Schneider C, Wong N, Bredemeyer A, Hulsmans M, Nahrendorf M, Epelman S, Kreisel D, Liu Y, Itoh A, Shankar TS, Selzman CH, Drakos SG, Lavine KJ. The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions. *Nature Medicine* 24: 1234–1245, 2018.
120. Bajpai G, Bredemeyer A, Li W, Zaitsev K, Koenig AL, Lokshina I, Mohan J, Ivey B, Hsiao HM, Weinheimer C, Kovacs A, Epelman S, Artyomov M, Kreisel D, Lavine KJ. Tissue Resident CCR2⁻ and CCR2⁺ Cardiac

- Macrophages Differentially Orchestrate Monocyte Recruitment and Fate Specification Following Myocardial Injury. *Circ Res* 124(2):263-278, 2018.
121. Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev Y v. CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation* 97: 4–13, 2017.
 122. Iqbal AJ, McNeill E, Kapellos TS, Regan-Komito D, Norman S, et al. Human CD68 promoter GFP transgenic mice allow analysis of monocyte to macrophage differentiation in vivo. *Blood* 124: e33–e44, 2014.
 123. Waddell LA, Lefevre L, Bush SJ, Raper A, Young R, Lisowski ZM, McCulloch MEB, Muriuki C, Sauter KA, Clark EL, Irvine KM, Pridans C, Hope JC, Hume DA. ADGRE1 (EMR1, F4/80) is a rapidly-evolving gene expressed in mammalian monocyte-macrophages. *Frontiers in Immunology* 9: 1–14, 2018.
 124. Tertrais M, Bigot C, Martin E, Poincloux R, Labrousse A, Maridonneau-Parini I. Phagocytosis is coupled to the formation of phagosome-associated podosomes and a transient disruption of podosomes in human macrophages. *Eur J Cell Biol* 100, 2021.
 125. Mily A, Kalsum S, Loreti MG, Rekha RS, Muvva JR, Lourda M, Brighenti S. Polarization of M1 and M2 Human Monocyte-Derived Cells and Analysis with Flow Cytometry upon Mycobacterium tuberculosis Infection. *J Vis Exp* 2020: 1–20, 2020.
 126. Rowinska Z, Koeppel TA, Sanati M, Schelzig H, Jankowski J, Weber C, Zernecke A, Liehn EA. Role of the CX3C chemokine receptor CX3CR1 in the pathogenesis of atherosclerosis after aortic transplantation. *PLoS ONE* 12: 1–9, 2017.
 127. Layoun A, Samba M, Santos MM. Isolation of murine peritoneal macrophages to carry out gene expression analysis upon toll-like receptors stimulation. *Journal of Visualized Experiments* 2015: 1–5, 2015.
 128. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* 38: 79–91, 2013.

129. Eligini S, Crisci M, Bono E, Songia P, Tremoli E, Colombo GI, Colli S. Human monocyte-derived macrophages spontaneously differentiated in vitro show distinct phenotypes. *Journal of Cellular Physiology* 228: 1464–1472, 2013.
130. Tarique AA, Logan J, Thomas E, Holt PG, Sly PD, Fantino E. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 53: 676–688, 2015.
131. Chistiakov DA, Myasoedova VA, Revin V v., Orekhov AN, Bobryshev Y v. The impact of interferon-regulatory factors to macrophage differentiation and polarization into M1 and M2. *Immunobiology* 223: 101–111, 2018.
132. Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK, Roy S. Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration. *American Journal of Pathology* 185: 2596–2606, 2015.
133. Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, Williams BRG, Major J, Hamilton TA, Fenton MJ, Vogel SN. TLR4, but not TLR2, mediates IFN- β -induced STAT α/β -dependent gene expression in macrophages. *Nature Immunology* 3: 392–398, 2002.
134. Lee KY. M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review. *Medical Biological Science and Engineering* 2: 1–5, 2019.
135. Xue Q, Yan Y, Zhang R, Xiong H. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 2018.
136. Azad AK, Rajaram MVS, Schlesinger LS. Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. *J Cytol Mol Biol* 1, 2014.
137. Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Léone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D, Gras G. Macrophage activation switching: An asset for the resolution of inflammation. *Clinical and Experimental Immunology* 142: 481–489, 2005.
138. Abdelaziz MH, Abdelwahab SF, Wan J, Cai W, Huixuan W, Jianjun C, Kumar KD, Vasudevan A, Sadek A, Su Z, Wang S, Xu H. Alternatively activated macrophages; a double-edged sword in allergic asthma. *Journal of Translational Medicine* 2020 18:1 18: 1–12, 2020.

139. Yao Y, Xu XH, Jin L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Frontiers in Immunology* 10: 792, 2019.
140. Gleissner CA. Macrophage phenotype modulation by CXCL4 in atherosclerosis. *Frontiers in Physiology* 3 JAN: 1–7, 2012.
141. Jin X, Kruth HS. Culture of macrophage colony-stimulating factor differentiated human monocyte-derived macrophages. *Journal of Visualized Experiments* 2016, 2016.
142. Beyer M, Mallmann MR, Xue J, Staratschek-Jox A, Vorholt D, Krebs W, Sommer D, Sander J, Mertens C, Nino-Castro A, Schmidt S v., Schultze JL. High-Resolution Transcriptome of Human Macrophages. *PLoS ONE* 7, 2012.
143. Starr T, Bauler TJ, Malik-Kale P, Steele-Mortimer O. The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with Salmonella Typhimurium. *PLoS ONE* 13, 2018.
144. Beyer M, Mallmann MR, Xue J, Staratschek-Jox A, Vorholt D, Krebs W, Sommer D, Sander J, Mertens C, Nino-Castro A, Schmidt S v., Schultze JL. High-Resolution Transcriptome of Human Macrophages. *PLoS ONE* 7, 2012.
145. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cellular Immunology* 281: 51–61, 2013.
146. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* 8: 533–544, 2008.
147. Jack GD, Zhang L, Friedman AD. M-CSF elevates c-Fos and phospho-C/EBP α (S21) via ERK whereas G-CSF stimulates SHP2 phosphorylation in marrow progenitors to contribute to myeloid lineage specification. *Blood* 114: 2172–2180, 2009.
148. Morón-Calvente V, Romero-Pinedo S, Toribio-Castelló S, Plaza-Díaz J, Abadía-Molina AC, Rojas-Barros DI, Beug ST, LaCasse EC, MacKenzie A, Korneluk R, Abadía-Molina F. Inhibitor of apoptosis proteins, NAIP, cIAP1 and cIAP2 expression during macrophage differentiation and M1/M2 polarization. *PLoS ONE* 13: 1–19, 2018.

149. Ohradanova-Repic A, Machacek C, Fischer MB, Stockinger H. Differentiation of human monocytes and derived subsets of macrophages and dendritic cells by the HLDA10 monoclonal antibody panel. *Clinical and Translational Immunology* 5: e55-9, 2016.
150. Mucci A, Kunkiel J, Suzuki T, Brenning S, Glage S, Kühnel MP, Ackermann M, Happel C, Kuhn A, Schambach A, Trapnell BC, Hansen G, Moritz T, Lachmann N. Murine iPSC-Derived Macrophages as a Tool for Disease Modeling of Hereditary Pulmonary Alveolar Proteinosis due to *Csf2rb* Deficiency. *Stem Cell Reports* 7: 292–305, 2016.
151. Neehus AL, Lam J, Haake K, Merkert S, Schmidt N, Mucci A, Ackermann M, Schubert M, Happel C, Kühnel MP, Blank P, Philipp F, Goethe R, Jonigk D, Martin U, Kalinke U, Baumann U, Schambach A, Roesler J, Lachmann N. Impaired IFN γ -Signaling and Mycobacterial Clearance in IFN γ R1-Deficient Human iPSC-Derived Macrophages. *Stem Cell Reports* 10: 7–16, 2018.
152. Lang J, Cheng Y, Rolfe A, Hammack C, Vera D, Kyle K, Wang J, Meissner TB, Ren Y, Cowan C, Tang H. An hPSC-Derived Tissue-Resident Macrophage Model Reveals Differential Responses of Macrophages to ZIKV and DENV Infection. *Stem Cell Reports* 11: 348–362, 2018.
153. Meghraoui-Kheddar A, Barthelemy S, Boissonnas A, Combadière C. Revising CX3CR1 Expression on Murine Classical and Non-classical Monocytes. *Frontiers in Immunology* 11: 1–7, 2020.
154. Burgess M, Wicks K, Gardasevic M, Mace KA. Cx3CR1 Expression Identifies Distinct Macrophage Populations That Contribute Differentially to Inflammation and Repair. *Immunohorizons* 3: 262–273, 2019.
155. Lee YS, Kim MH, Yi HS, Kim SY, Kim HH, Kim JH, Yeon JE, Byun KS, Byun JS, Jeong W il. CX3CR1 differentiates F4/80^{low} monocytes into pro-inflammatory F4/80^{high} macrophages in the liver. *Scientific Reports* 8: 1–13, 2018.
156. Sager HB, Hulsmans M, Lavine KJ, Moreira MB, Heidt T, Courties G, et al. Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure. *Circulation Research* 119: 853–864, 2016.

157. Ma Y, Mouton AJ, Lindsey ML. Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction. *Transl Res.* 191:15-28, 2018.
158. Hulsmans M, Sager HB, Roh JD, Valero-Muñoz M, Houstis NE, et al. Cardiac macrophages promote diastolic dysfunction. *Journal of Experimental Medicine* 215: 423–440, 2018.
159. Hulsmans M, Clauss S, Xiao L, Aguirre AD, King KR, Hanley A, et al. Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell* 169: 510-522.e20, 2017.
160. Wang Y, Yao F, Wang L, Li Z, Ren Z, Li D, Zhang M, Han L, Wang S Qiang, Zhou B, Wang L. Single-cell analysis of murine fibroblasts identifies neonatal to adult switching that regulates cardiomyocyte maturation. *Nature Communications* 11, 2020.
161. Walter W, Alonso-Herranz L, Trappetti V, Crespo I, Ibberson M, et al. Deciphering the Dynamic Transcriptional and Post-transcriptional Networks of Macrophages in the Healthy Heart and after Myocardial Injury. *Cell Reports* 23: 622–636, 2018.
162. Klaourakis K, Vieira JM, Riley PR. The evolving cardiac lymphatic vasculature in development, repair and regeneration. *Nature Reviews Cardiology*: 368–379, 2021.
163. Koc A, Cagavi E. Cardiac Immunology: A New Era for Immune Cells in the Heart. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1-21, 2020.
164. Liu Z, Wang L, Welch JD, Ma H, Zhou Y, Vaseghi HR, et al. Single-cell transcriptomics reconstructs fate conversion from fibroblast to cardiomyocyte. *Nature* 551: 100–104, 2017.
165. Nicolás-Ávila JA, Lechuga-Vieco A v., Esteban-Martínez L, Sánchez-Díaz M, Díaz-García E, et al. A Network of Macrophages Supports Mitochondrial Homeostasis in the Heart. *Cell* 183: 94-109.e23, 2020.
166. Zhang H, Xu A, Sun X, Yang Y, Zhang L, Bai H, et al. Self-Maintenance of Cardiac Resident Reparative Macrophages Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy Through the SR-A1-c-Myc Axis. *Circ Res* 127: 610–627, 2020.

167. Sun Z, Zhou D, Xie X, Wang S, Wang Z, Zhao W, Xu H, Zheng L. Cross-talk between macrophages and atrial myocytes in atrial fibrillation. *Basic Research in Cardiology* 111: 1–19, 2016.
168. Sun Z, Ying X, Zhao W, He Y, Wang Z, Zheng L, Chen W, Xu H. M2c macrophages prevent atrial fibrillation in association with the inhibition of KCNQ1 in human embryonic stem cell-derived atrial-like cardiomyocytes. *Hellenic Journal of Cardiology* 62 Hellenic Cardiological Society: 457–459, 2021.
169. Yang L, Han Y, Jaffré F, Nilsson-Payant BE, Bram Y, Wang P, Zhu J, Zhang T, Redmond D, Houghton S, Uhl S, Borczuk A, Huang Y, Richardson C, Chandar V, Acklin JA, Lim JK, Chen Z, Xiang J, Ho DD, Tenover BR, Schwartz RE, Evans T, Chen S. An Immuno-Cardiac Model for Macrophage-Mediated Inflammation in COVID-19 Hearts. *Circ Res.* 129(1): 33-46, 2021.
170. Wang Y, Yao F, Wang L, Li Z, Ren Z, Li D, Zhang M, Han L, Wang S Qiang, Zhou B, Wang L. Single-cell analysis of murine fibroblasts identifies neonatal to adult switching that regulates cardiomyocyte maturation. *Nature Communications* 11, 2020.
171. Noonan J, Grassia G, MacRitchie N, Garside P, Guzik TJ, Bradshaw AC, Maffia P. A novel triple-cell two-dimensional model to study immune vascular interplay in atherosclerosis. *Frontiers in Immunology* 10: 1–9, 2019.
172. Venter C, Niesler C. A triple co-culture method to investigate the effect of macrophages and fibroblasts on myoblast proliferation and migration. <https://doi.org/10.2144/btn-2017-0100> 64: 52–58, 2018.
173. Jackson M, Krasnodembskaya A. Analysis of Mitochondrial Transfer in Direct Co-cultures of Human Monocyte-derived Macrophages (MDM) and Mesenchymal Stem Cells (MSC). *Bio-Protocol* 7, 2017.
174. Noel G, Baetz NW, Staab JF, Donowitz M, Kovbasnjuk O, Pasetti MF, Zachos NC. A primary human macrophage-enteroid co-culture model to investigate mucosal gut physiology and host-pathogen interactions. *Scientific Reports* 7: 1–14, 2017.
175. Shah S, Lee H, Park YH, Jeon E, Chung HK, Lee ES, Shim JH, Kang K-T. Three-dimensional Angiogenesis Assay System using Co-culture Spheroids

- Formed by Endothelial Colony Forming Cells and Mesenchymal Stem Cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 2019: e60032, 2019.
176. Hussain A, Collins G, Yip D, Cho CH. Functional 3-D cardiac co-culture model using bioactive chitosan nanofiber scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering* 110: 637–647, 2013.
 177. Song SY, Yoo J, Go S, Hong J, Su Sohn H, Lee JR, Kang M, Jeong GJ, Ryu S, Kim SHL, Hwang NS, Char K, Kim BS. Cardiac-mimetic cell-culture system for direct cardiac reprogramming. *Theranostics* 9: 6734–6744, 2019.
 178. Meng YF, Pu Q, Dai SY, Ma Q, Li X, Zhu W. Nicotinamide Mononucleotide Alleviates Hyperosmolarity-Induced IL-17a Secretion and Macrophage Activation in Corneal Epithelial Cells/Macrophage Co-Culture System. *J Inflamm Res* 14: 479–493, 2021.
 179. Kuen J, Darowski D, Kluge T, Majety M. Pancreatic cancer cell/fibroblast co-culture induces M2 like macrophages that influence therapeutic response in a 3D model. *PLoS One* 12, 2017.
 180. Dunn KK, Reichardt IM, Simmons AD, Jin G, Floy ME, Hoon KM, Palecek SP. Coculture of Endothelial Cells with Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors Reveals a Differentiation Stage-Specific Enhancement of Cardiomyocyte Maturation. *Biotechnology Journal* 14: 1–13, 2019.
 181. Haenseler W, Sansom SN, Buchrieser J, Newey SE, Moore CS, Nicholls FJ, et al. A Highly Efficient Human Pluripotent Stem Cell Microglia Model Displays a Neuronal-Co-culture-Specific Expression Profile and Inflammatory Response. *Stem Cell Reports* 8: 1727–1742, 2017.
 182. Tu MG, Chen YW, Shie MY. Macrophage-mediated osteogenesis activation in co-culture with osteoblast on calcium silicate cement. *J Mater Sci Mater Med* 26: 1–10, 2015.
 183. Cho DI, Kim MR, Jeong HY, Jeong HC, Jeong MH, Yoon SH, Kim YS, Ahn Y. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Experimental and Molecular Medicine* 46: 1–9, 2014.

184. Zhang H, Yue Y, Sun T, Wu X, Xiong S. Transmissible endoplasmic reticulum stress from myocardiocytes to macrophages is pivotal for the pathogenesis of CVB3-induced viral myocarditis. *Scientific Reports* 7: 1–14, 2017.
185. Ai X, Lu W, Zeng K, Li C, Jiang Y, Tu P. Microfluidic Coculture Device for Monitoring of Inflammation-Induced Myocardial Injury Dynamics. *Anal Chem* 90(7): 4485-4494, 2018.
186. Hitscherich PG, Xie LH, del Re D, Lee EJ. The effects of macrophages on cardiomyocyte calcium-handling function using in vitro culture models. *Physiological Reports* 7: 1–15, 2019.
187. Fei YD, Wang Q, Hou JW, Li W, Cai XX, Yang YL, Zhang LH, Wei ZX, Chen TZ, Wang YP, Li YG. Macrophages facilitate post myocardial infarction arrhythmias: Roles of gap junction and KCa3.1. *Theranostics* 9: 6396–6411, 2019.
188. Kim YS, Jeong HY, Kim AR, Kim WH, Cho H, Um J, Seo Y, Kang WS, Jin SW, Kim MC, Kim YC, Jung DW, Williams DR, Ahn Y. Natural product derivative BIO promotes recovery after myocardial infarction via unique modulation of the cardiac microenvironment. *Scientific Reports* 6: 1–13, 2016.
189. Sheng XY, Qu Y, Dan P, Lin E, Korthout L, Bradford A, Hove-Madsen L, Sanatani S, Tibbits GF. Isolation and characterization of atrioventricular nodal cells from neonate rabbit heart. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 4: 936–946, 2011.
190. Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, Sato Y, Amano N, Watanabe A, Goshima N, Yamanaka S. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells* 31: 458–466, 2013.
191. Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, Hsiao C, Kamp TJ, Palecek SP. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nature Protocols* 8: 162–175, 2013.
192. Miller DJ, Balaram P, Young NA, Kaas JH. Three counting methods agree on cell and neuron number in chimpanzee primary visual cortex. *Frontiers in Neuroanatomy* 8: 36, 2014.

193. Bosshart H, Heinzelmann M. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Annals of Translational Medicine* 4, 2016.
194. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE* 5, 2010.
195. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cellular Immunology* 281: 51–61, 2013.
196. Mia S, Warnecke A, Zhang XM, Malmström V, Harris RA. An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- β yields a dominant immunosuppressive phenotype. *Scandinavian Journal of Immunology* 79: 305–314, 2014.
197. Yan Q, Ahn S, Fowler V. Macrophage Phagocytosis Assay of *Staphylococcus aureus* by Flow Cytometry. *Bio-Protocol* 5: 1–7, 2015.
198. DeBerge M, Zhang S, Ginton K, Grigoryeva L, Hussein I, Vorovich E, Ho K, Luo X, Thorp EB. Efferocytosis and outside-in signaling by cardiac phagocytes. Links to repair, cellular programming, and intercellular crosstalk in heart. *Frontiers in Immunology* 8: 1–21, 2017.
199. Lemaire S, Minget-Leclercq MP, Tulkens PM, van Bambeke F. Study of macrophage functions in murine J774 cells and human activated THP-1 cells exposed to oritavancin, a lipoglycopeptide with high cellular accumulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58: 2059–2066, 2014.
200. Wang J, Yao Y, Xiong J, Wu J, Tang X, Li G. Evaluation of the inflammatory response in macrophages stimulated with exosomes secreted by mycobacterium avium -infected macrophages. *BioMed Research International*, 2015.
201. Jayasinghe SN. Reimagining Flow Cytometric Cell Sorting. *Adv Biosyst* 4: e2000019, 2020.
202. Alventosa-Zaidin M, Pera G, Roca Saumell C, Mengual Miralles N, Zamora Sanchez M., Gros Garcia T, Guix Font L, Benitez Camps M, Francisco-Pascual

- J, Brugada Terradellas J. Diagnosis of right bundle branch block: a concordance study. *BMC Family Practice* 20, 2019.
203. Marchlinski DF, Tschabrunn CM, Zado ES, Santangeli P, Marchlinski FE. Right bundle branch block ventricular tachycardia in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy more commonly originates from the right ventricle: Criteria for identifying chamber of origin. *Heart Rhythm* 18: 163–171, 2021.
 204. Botelho AFM, Joviano-Santos J v., Santos-Miranda A, Menezes-Filho JER, Soto-Blanco B, Cruz JS, Guatimosim C, Melo MM. Non-invasive ECG recording and QT interval correction assessment in anesthetized rats and mice. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 39: 409–415, 2019.
 205. Saito A, Ohno S, Nuruki N, Nomura Y, Horie M, Yoshinaga M. Three cases of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia with prolonged QT intervals including two cases of compound mutations. *Journal of Arrhythmia* 34: 291, 2018.
 206. Karki R, Raina A, Ezzeddine FM, Bois MC, Asirvatham SJ. Anatomy and Pathology of the Cardiac Conduction System. *Card Electrophysiol Clin.* 13(4):569-584, 2021.
 207. Weisheit CK, Kleiner JL, Rodrigo MB, Niepmann ST, Zimmer S, Duerr GD, Coburn M, Kurts C, Frede S, Eichhorn L. CX3CR1 is a prerequisite for the development of cardiac hypertrophy and left ventricular dysfunction in mice upon transverse aortic constriction. *PLoS ONE* 16, 2021.
 208. Aanhaanen WTJ. The role of Tbx2 in the development of the atrioventricular canal and conduction system of the heart. ISBN: 9789461910837, 2011.
 209. AlMahameed ST, Ziv O. Ventricular Arrhythmias. *Med Clin North Am.* 103(5):881-895, 2019.
 210. Al-Salameh A, Fysekidis M. QT Interval After Bariatric Surgery. *Metabolism and Pathophysiology of Bariatric Surgery Nutrition, Procedures, Outcomes and Adverse Effects* 521-528, 2017.
 211. Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, Raval KK, Zhang J, Kamp TJ, Palecek SP. Robust cardiomyocyte differentiation from

- human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2012.
212. Iwaki H, Sasaki S, Matsushita A, Ohba K, Matsunaga H, Misawa H, Oki Y, Ishizuka K, Nakamura H, Suda T. Essential role of TEA domain transcription factors in the negative regulation of the MYH 7 gene by thyroid hormone and its receptors. *PLoS ONE* 9, 2014.
 213. Liu Y, Kao WJ. Human macrophage adhesion on fibronectin: the role of substratum and intracellular signalling kinases. *Cell Signal* 14: 145–152, 2002.
 214. Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer* 15, 2015.
 215. Forrester MA, Wassall HJ, Hall LS, Cao H, Wilson HM, Barker RN, Vickers MA. Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. *Cellular Immunology* 332: 58–76, 2018.
 216. Kim H, Young Wang S, Kwak G, Yang Y, Chan Kwon I, Hwa Kim S, Kim H, Wang SY, Kwak G, Kwon IC, Yang Y, Kim SH. Exosome-Guided Phenotypic Switch of M1 to M2 Macrophages for Cutaneous Wound Healing. *Advanced Science* 6: 1900513, 2019.
 217. Pelegriin P, Surprenant A. Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1B release through pyrophosphates. *EMBO Journal* 28: 2114–2127, 2009.
 218. Dong C, Zhao G, Zhong M, Yue Y, Wu L, Xiong S. RNA sequencing and transcriptomal analysis of human monocyte to macrophage differentiation. *Gene* 519: 279–287, 2013.
 219. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *The Journal of Immunology* 177: 7303–7311, 2006.
 220. Hitscherich PG, Xie LH, del Re D, Lee EJ. The effects of macrophages on cardiomyocyte calcium-handling function using in vitro culture models. *Physiological Reports* 7: 1–15, 2019.

221. Adutler-Lieber S, Ben-Mordechai T, Naftali-Shani N, Asher E, Loberman D, Raanani E, Leor J. Human macrophage regulation via interaction with cardiac adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 18: 78–86, 2013.
222. Kouvas N, Kontogiannis C, Georgiopoulos G, Spartalis M, Tsilimigras DI, Spartalis E, Kapelouzou A, Kosmopoulos M, Chatzidou S. The complex crosstalk between inflammatory cytokines and ventricular arrhythmias. *Cytokine* 111 Academic Press: 171–177, 2018.
223. On C, J P, E M. The Immunoregulatory Role of Cytokines in Congestive Heart Failure. *Interdisciplinary Journal of Microinflammation* 01, 2014.
224. Cho DI, Kang H jin, Jeon JH, Eom GH, Cho HH, Kim MR, Cho M, Jeong H yun, Cho HC, Hong MH, Kim YS, Ahn Y. Antiinflammatory activity of ANGPTL4 facilitates macrophage polarization to induce cardiac repair. *JCI Insight* 4, 2019.
225. Xiong T, Yang XQ, Wang DX. Macrophage: Beyond cardiac structural remodelling. *European Heart Journal* 40: 1013, 2019.
226. Azad TD, Donato M, Heylen L, Liu AB, Shen-Orr SS, Sweeney TE, Maltzman JS, Naesens M, Khatri P. Inflammatory macrophage-associated 3-gene signature predicts subclinical allograft injury and graft survival. *JCI Insight* 3, 2018.
227. Godwin JW, Debuque R, Salimova E, Rosenthal NA. Heart regeneration in the salamander relies on macrophage-mediated control of fibroblast activation and the extracellular landscape. *Regenerative Medicine* 2: 1–11, 2017.
228. Macfarlane PW. The Influence of Age and Sex on the Electrocardiogram. *Adv Exp Med Biol* 1065: 93–106, 2018.
229. Rowinska Z, Koeppel TA, Sanati M, Schelzig H, Jankowski J, Weber C, Zerneck A, Liehn EA. Role of the CX3C chemokine receptor CX3CR1 in the pathogenesis of atherosclerosis after aortic transplantation. *PLoS ONE* 12, 2017.
230. Lee YS, Kim MH, Yi HS, Kim SY, Kim HH, Kim JH, Yeon JE, Byun KS, Byun JS, Jeong W il. CX3CR1 differentiates F4/80^{low} monocytes into pro-inflammatory F4/80^{high} macrophages in the liver. *Scientific Reports* 8, 2018.

231. Heidt T, Courties G, Dutta P, Sager HB, Sebas M, Iwamoto Y, Sun Y, da Silva N, Panizzi P, van der Lahn AM, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M. Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction. *Circulation Research* 115: 284–295, 2014.
232. Swirski FK, Robbins CS, Nahrendorf M. Development and Function of Arterial and Cardiac Macrophages. *Trends in Immunology* 37 Elsevier Ltd: 32–40, 2016.
233. Nahrendorf M, Swirski FK. Monocyte and macrophage heterogeneity in the heart. *Circulation Research* 112: 1624–1633, 2013.
234. Jung K, Kim P, Leuschner F, Gorbатов R, Kim JK, Ueno T, Nahrendorf M, Yun SH. Endoscopic time-lapse imaging of immune cells in infarcted mouse hearts. *Circulation Research* 112: 891–899, 2013.
235. Chávez-Galán L, Olleros ML, Vesin D, Garcia I. Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages. *Frontiers in Immunology* 6 Frontiers Media S.A. 2015.
236. Pinto AR, Paolicelli R, Salimova E, Gospocic J, Slonimsky E, Bilbao-Cortes D, Godwin JW, Rosenthal NA. An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile. *PLoS ONE* 7, 2012.
237. Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, et al. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* 40: 91–104, 2014.
238. Burgess M, Wicks K, Gardasevic M, Mace KA. Cx3CR1 Expression Identifies Distinct Macrophage Populations That Contribute Differentially to Inflammation and Repair. *Immunohorizons* 3: 262–273, 2019.
239. Honold L, Nahrendorf M. Resident and Monocyte-Derived Macrophages in Cardiovascular Disease. *Circulation Research* 122: 113–127, 2018.
240. Lee YS, Kim MH, Yi HS, Kim SY, Kim HH, Kim JH, Yeon JE, Byun KS, Byun JS, Jeong W il. CX3CR1 differentiates F4/80^{low} monocytes into pro-inflammatory F4/80^{high} macrophages in the liver. *Scientific Reports* 8: 1–13, 2018.

241. O'Rourke SA, Dunne A, Monaghan MG. The Role of Macrophages in the Infarcted Myocardium: Orchestrators of ECM Remodeling. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 6 Frontiers Media S.A. 2019.
242. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *Journal of Experimental Medicine* 204: 3037–3047, 2007.
243. Butoi ED, Gan AM, Manduteanu I, Stan D, Calin M, Pirvulescu M, Koenen RR, Weber C, Simionescu M. Cross talk between smooth muscle cells and monocytes/activated monocytes via CX3CL1/CX3CR1 axis augments expression of pro-atherogenic molecules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813: 2026–2035, 2011.
244. Meyer Dos Santos S, Klinkhardt U, Scholich K, Nelson K, Monsefi N, Deckmyn H, Kuczka K, Zorn A, Harder S. The CX3C chemokine fractalkine mediates platelet adhesion via the von Willebrand receptor glycoprotein Ib. *Blood* 117: 4999–5008, 2011.
245. Hildemann SK, Schulz C, Fraccarollo D, Schöpp C, Flierl U, Wissel K, Pelisek J, Massberg S, Bauersachs J, Schäfer A. Fractalkine promotes platelet activation and vascular dysfunction in congestive heart failure. *Thrombosis and Haemostasis* 111: 725–735, 2013.
246. Richter B, Koller L, Hohensinner PJ, Rychli K, Zorn G, Goliasch G, Berger R, Mörtl D, Maurer G, Huber K, Pacher R, Wojta J, Hülsmann M, Niessner A. Fractalkine is an independent predictor of mortality in patients with advanced heart failure. *Thrombosis and Haemostasis* 108: 1220–1227, 2012.
247. Poupel L, Boissonnas A, Hermand P, Dorgham K, Guyon E, Auvynet C, Charles F saint, Lesnik P, Deterre P, Combadiere C. Pharmacological inhibition of the chemokine receptor, CX3CR1, reduces atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33: 2297–2305, 2013.
248. Vuorenperä H, Penttinen K, Heinonen T, Pekkanen-Mattila M, Sarkanen JR, Ylikomi T, Aalto-Setälä K. Maturation of human pluripotent stem cell derived

- cardiomyocytes is improved in cardiovascular construct. *Cytotechnology* 69: 785–800, 2017. doi: 10.1007/s10616-017-0088-1.
249. Koc A, Cagavi E. Replating Protocol for Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Methods Mol Biol.* 2520:161-170, 2022.
 250. King JH, Wickramarachchi C, Kua K, Du Y, Jeevaratnam K, Matthews HR, Grace AA, Huang CLH, Fraser JA. Loss of Nav1.5 expression and function in murine atria containing the RyR2-P2328S gain-of-function mutation. *Cardiovasc Res* 99: 751–759, 2013.
 251. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: A dynamic balance. *Nature Reviews Immunology* 13: 709–721, 2013.
 252. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, vanGinderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* 41: 14–20, 2014.
 253. Gombozhapova A, Rogovskaya Y, Shurupov V, Rebenkova M, Kzhyshkowska J, Popov S v., Karpov RS, Ryabov V. Macrophage activation and polarization in post-infarction cardiac remodeling. *Journal of Biomedical Science* 24: 1–11, 2017.
 254. Fontes MSC, van Veen TAB, de Bakker JMT, van Rijen HVM. Functional consequences of abnormal Cx43 expression in the heart. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1818: 2020–2029, 2012.
 255. Bao X, Altenberg GA, Reuss L. Mechanism of regulation of the gap junction protein connexin 43 by protein kinase C-mediated phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, 2004.
 256. Tse G, Yeo JM. Conduction abnormalities and ventricular arrhythmogenesis: The roles of sodium channels and gap junctions. *IJC Heart and Vasculature* 9: 75–82, 2015.
 257. Hulsmans M, Clauss S, Xiao L, Aguirre AD, King KR, Hanley A, et al. Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell* 169: 510-522.e20, 2017.

258. Zhang J, Liang Y, Bradford WH, Sheikh F. Desmosomes: emerging pathways and non-canonical functions in cardiac arrhythmias and disease. *Biophysical Reviews* 13: 697–706, 2021.
259. Fei YD, Wang Q, Hou JW, Li W, Cai XX, Yang YL, Zhang LH, Wei ZX, Chen TZ, Wang YP, Li YG. Macrophages facilitate post myocardial infarction arrhythmias: Roles of gap junction and KCa3.1. *Theranostics* 9: 6396–6411, 2019.
260. de Couto G, Liu W, Tseliou E, Sun B, Makkar N, Kanazawa H, Arditi M, Marbán E. Macrophages mediate cardioprotective cellular postconditioning in acute myocardial infarction. *Journal of Clinical Investigation* 125: 3147–3162, 2015.
261. Zhou X, Li Z, Wang Z, Chen E, Wang J, Chen F, Jones O, Tan T, Chen S, Takeshima H, Bryant J, Ma J, Xu X. Syncytium calcium signaling and macrophage function in the heart. *Cell and Bioscience* 8: 1–9, 2018.
262. Seegren P v., Downs TK, Stremska ME, Harper LR, Cao R, Olson RJ, Upchurch CM, Doyle CA, Kennedy J, Stipes EL, Leitingner N, Periasamy A, Desai BN. Mitochondrial Ca²⁺ Signaling Is an Electrometabolic Switch to Fuel Phagosome Killing. *Cell Reports* 33: 108411, 2020.
263. Spencer CI, Baba S, Nakamura K, Hua EA, Sears MAF, Fu CC, Zhang J, Balijepalli S, Tomoda K, Hayashi Y, Lizarraga P, Wojciak J, Scheinman MM, Aalto-Setälä K, Makielski JC, January CT, Healy KE, Kamp TJ, Yamanaka S, Conklin BR. Calcium transients closely reflect prolonged action potentials in iPSC models of inherited cardiac arrhythmia. *Stem Cell Reports* 3: 269–281, 2014.
264. Kiviahho AL, Ahola A, Larsson K, Penttinen K, Swan H, Pekkanen-Mattila M, Venäläinen H, Paavola K, Hyttinen J, Aalto-Setälä K. Distinct electrophysiological and mechanical beating phenotypes of long QT syndrome type 1-specific cardiomyocytes carrying different mutations. *Int J Cardiol Heart Vasc* 8: 19–31, 2015.
265. Yin J, Hu H, Li X, Xue M, Cheng W, Wang Y, Xuan Y, Li X, Yang N, Shi Y, Yan S. Inhibition of Notch signaling pathway attenuates sympathetic hyperinnervation together with the augmentation of M2 macrophages in rats

post-myocardial infarction. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 310: C41–C53, 2016.

266. Yoneyama M, Nakayama Y, Kawahara K. Coupling between contraction rhythm and calcium oscillation in a cultured cardiac myocyte: Fluctuation behaviour and its modelling. *Biological Rhythm Research* 37:117–130, 2006.



10. ETİK KURUL ONAYI



E-İmzalıdır

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 10840098-604.01.01-E.53607
Konu : Etik Kurulu Kararı

20/12/2018

Sayın Arzuhan KOÇ YILDIRIM

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Konjenital Aritmi Patogeneğinde Kardiyomiyosit ve Makrofaj Etkileşiminin İn Vitro ve İn Vivo Modellerde Araştırılması” isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Ek:

-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 20.12.2018 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 0CAB5F43X3 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Tel: 444 85 44

Kavacık Mah. Ekinçiler Cad. No.19 Kavacık Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Konjenital Aritmi Patogenezinde Kardiyomiyosit ve Makrofaj Etkileşiminin İn Vitro ve İn Vivo Modellerde Araştırılması			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Arzuhan Koç Yıldırım			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
Karar Bilgileri	Karar No: 755	Tarih: 19/12/2018		
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr. Öğr. Üyesi Devrim TARAKCI	Ergoterapi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Dr. Öğr. Üyesi Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr. Öğr. Üyesi Keziban OLCAY	Endodonti	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Toplantıda Bulunma



E-İmzalıdır

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 10840098-604.01.01-E.54521
Konu : Etik Kurulu Kararı

28/12/2018

Sayın Arzuhan KOÇ YILDIRIM

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Konjenital Aritmi Patogeneğinde Kardiyomiyosit ve Makrofaj Etkileşiminin In Vitro ve In Vivo Modellerde Araştırılması” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Ek:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 28.12.2018 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 678C33ADXD kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacık Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
28/12/2018	97		Arzuhan KOÇ YILDIRIM

“Konjenital Aritmi Patogeneğinde Kardiyomiyosit ve Makrofaj Etkileşiminin In Vitro ve In Vivo Modellerde Araştırılması” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “**Oybirliği**” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 36 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Turan DEMİRCAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet OZANSOY	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	