T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

TORASİK AORTA UYGULANAN PULSLU MANYETİK ALANIN APOPTOTİK ETKİLERİNİN KASILMA PARAMETRELERİ ÜZERİNDEN İNCELENMESİ

İlknur BALDAN

BİYOFİZİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. İsmail GÜNAY

ADANA-2017

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

TORASİK AORTA UYGULANAN PULSLU MANYETİK ALANIN APOPTOTİK ETKİLERİNİN KASILMA PARAMETRELERİ ÜZERİNDEN İNCELENMESİ

İlknur BALDAN

BİYOFİZİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. İsmail GÜNAY

Bu Tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TYL-2017- 7887 nolu proje ile desteklenmiştir.

ADANA-2017

KABUL VE ONAY

Biyofizik Anabilim Dalı

Biyofizik Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

"Torasik Aorta Uygulanan Pulslu Manyetik Alanın Apoptotik Etkilerinin Kasılma Parametreleri Üzerinden İncelenmesi"

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 14 / 08 / 2017

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. İsmail GÜNAY
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Doç. Dr. Aykut PELİT
Çukurova Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Can DEMİREL
Gaziantep Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS

ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 14/08/ 2017

İlknur BALDAN

Kayıtlı olunan Program : Ç. Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik ABD
Tezin Konusu :

Tezin Türü : Yüksek Lisans : ☒ Doktora: ☐

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. İsmail GÜNAY
Danışmanın İletişim Bilgileri : Ç.Ü Tıp Fakültesi
Telefon : 0322 338 6060- 3473
E-Posta : igunay@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri
Telefon : 553 543 67 40
E-Posta : baldanilknur@gmail.com
Adresi :

**Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının her aşamasında desteğini hissettiğim, yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. İsmail GÜNAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez konumun belirlenmesinde ve tezimin oluşma aşamasında sürekli destek olan, deneyim ve bilgilerini hiçbir zaman esirgemeyen hocam Sayın Dr.Figen ÇİÇEK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitimim sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım bölümümüzün diğer öğretim üyelerine sayın hocalarım Doç. Dr. Işıl ÖCAL ve Doç. Dr. Aykut PELIT'e teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerim sırasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Çağıl COŞKUN'a Biyofizik Anabilim Dalı sekreterimiz Perihan YEŞİL'e, hizmetlimiz Metin DUMAN'a teşekkür ederim.

Tüm eğitim-öğretim hayatım boyunca maddi-manevi her konuda beni destekleyen, sabır gösteren başta sevgili annem ve babam olmak üzere değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini her zaman derinden hissettiğim ve her zor anımda yanımda olan nişanlım, arkadaşım, her şeyim Hasan Hüseyin IŞIK'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ iix
ÖZET xi
ABSTRACT xii
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİ 5
2.1 Manyetik Alan Kaynakları 5
2.1.1 Biot-Savart Yasası ve Helmholtz Halkaları 5
2.1.2 Uzun bir doğrusal teldeki akımın oluşturduğu manyetik alan 6
2.1.3 Uzun Bir Doğrusal Telin Oluşturduğu Alanın Grafiği 7
2.1.4 Helmholtz Halkaları 9
2.2 Amper Yasası ve Solenoid 10
2.2.1 Sonsuz Uzun Bir Solenoid Içindeki Manyetik Alan 11
2.3 Solenoid Ve Helmholt Halkalarıyla Elde Edilen Manyetik Alanların Karşılaştırılması 12
2.4 Elektromanyetik alanların Biyolojik Sistemlere Etkisi 13
2.5 Tarihçe 16
2.6 Pulslu Manyetik Alan ve Apoptoz 17
2.7 Apoptoz 19
2.8 Vasküler Düz Kas Kasılması 20
2.9 Nitrik Oksit Biyosentezi 23
2.10 NO'nun Vasküler sisteme Etkileri 24
2.11 Hidrojen Peroksit ve Apoptoz 25
2.12 Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi 25
2.13 Hücre İçi Ca^{+2} Sinyalinin Oluşumu 26
3. GEREÇ VE YÖNTEM 29
3.1 Sıçanların Temin Edilmesi 29
3.2 Deney Grupları 29
3.3 Sıçanların Bakımı 29
3.4 Pulslu Manyetik Alan Sistemi 30
3.5 Deney Hayvanlarına Pulslu Manyetik Alan Uygulanması 31
3.6 Vasküler Aktivitenin İncelenmesi 33
3.7 Kültür Hücrelerinin Büyütülmesi 35
3.7.1 Primer Hücre Kültürünün Hazırlanması 36
3.8 Hücre Kültürlerinin Fura 2-am floresans boya ile yüklenmesi 36
3.9 Ca^{+2} Sinyalinin Floresans Mikroskopu ile görüntülenmesi 37
3.10 Kullanılan Kimyasallar 37

3.11 Sonuçların değerlendirilmesi 38
4. BULGULAR 40
4.1 PMA'nın Kasılma Yanıtlarına Etkisi 40
4.2 PMA'nın Vasküler Düz Kas Kasılma Yanıtlarına Etkisinin H2O2'nin Akut Etkinliği Üzerinden İncelenmesi 43
4.2.1. .. H_2O_2'nin Tek Başına Uygulanması 43
4.2.2. . H_2O_2'nin Fenilefrin ile Birlikte Uygulanması 44
4.2.3. . H_2O_2'nin KCl ile Birlikte Uygulanması 46
4.3 H2O2 ile Apoptoz Başlatılan Vasküler Dokuda PMA'nın Kasılma Yanıtlarına Etkisi 46
4.3.1.Apoptotik süreçlerde PMA'nın Etkisinin Fenilefrin Yanıtları Üzerinden İncelenmesi 46
4.3.2.Apoptotik Süreçlerde PMA'nın Etkisinin KCl Yanıtları Üzerinden İncelenmesi 48
4.4 Hücrede Ca^{+2} Sinyalinin Ölçümü 50
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 52
5.1 Fenilefrin ve KCl için Kasılma Yanıtları 52
5.2 PMA Uygulamasının Fenilefrin ve KCl Yanıtlarına Etkisi 52
5.3 Vazoaktif Ajan H_2O_2 Varlığında Hücre İçi Ca^{+2} ve Kasılma Yanıtları 52
5.4 H_2O_2 Uyarısının Hücre İçi Ca^{+2} Değişimine Etkisi 54
5.5 H_2O_2'nin Aortta Oluşturduğu Kasılma Yanıtlarının Ölçümü 54
5.6 Fenilefrin Üzerine eklenen H_2O_2 Yanıtlarına PMA Etkisi 55
6. KAYNAKÇA 58
ÖZGEÇMİŞ 65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Bir Idl akım elemanının bir P noktasındaki alana yaptığı katkı $d\vec{B}$ dir. $Id\vec{l}$ ile $\hat{r}$, şekil düzlemi içindeyseler, $d\vec{B}$ düzleme dik ve dışına doğrudur..... 5

Şekil 2.2 Bir I akımı taşıyan uzun bir doğrusal tel. Bir Idl akım elemanı, P noktasında manyetik alana bir $d\vec{B}$ katkısı yapar. $d\vec{B}$ nin yönü şekil düzleminden dışarıya doğrudur.. 6

Şekil 2.3 Bir dairesel halkanın akım elemanı halkanın ekseni üzerindeki P noktasında alana bir $d\vec{B}$ katkısı yapar. $Id\vec{l}$ ile $\hat{r}$ bir birine diktir.. 8

Şekil 2.4 *R* yarıçaplı bir dairesel halkanın merkezinden geçen *x* ekseni boyunca oluşan manyetik alan her iki tarafta simetriktir.. 8

Şekil 2.5 Aralarındaki uzaklık yarıçap (*R*) kadar olan Helmoltz halkalarının ortasından (*x*= 0) itibaren değişik noktalarda oluşan manyetik alan. 9

Şekil 2.6 Akım taşıyan uzun bir doğrusal telin oluşturduğu manyetik alanın çizgileri teli çevreler. Çember yolun her noktasında $\vec{B}$ ile $d\vec{l}$ paraleldir. 10

Şekil 2.7 Sık sarımlı L_0 uzunluğundaki bir selenoid içindeki alan. 12

Şekil 2.8 Akım taşıyan uzun bir doğrusal telin oluşturduğu manyetik alanın çizgileri teli çevreler. Çember yolun her noktasında $\vec{B}$ ile $d\vec{l}$ paraleldir. 12

Şekil 2.9 Helmholtz halkaları ve solonoid içinde, merkezdeki eksende meydana gelen manyetik alanın, orta noktalardan itibaren (*x*) değişmesi. Aralarındaki uzaklık Helmholtz halkalarının yarıçapına (*R*) eşittir. Solenoidin uzunluğu da yarıçap (*L*=*R*) kadardır. 13

Şekil 2.10 Düz kas kasılmasında rol oynayan proteinler ve sinyal yolakları (28). 16

Şekil 2.11 İyonize radyasyon ile hücrede apoptotik süreçlerin tetiklenmesi (58). 20

Şekil 2.12 Düz kas kasılma mekanizması. 21

Şekil 2.13 Düz Kas Gevşeme mekanizması 23

Şekil 2.14 NO sentezi 24

Şekil 3.1 Üzerinden I akımı geçerken Helmholtz halkaları arasında oluşan manyetik alan Tesla metre veya standart araştırma halkası ile ölçülebilir ve biçimi gözlenebilir. Helmholtz halkalarından geçen I akımının büyüklüğü ve biçimi ise, halkalara seri bağlı R direnci aracılığı ile ölçülür ve gözlenir 30

Şekil 3.2 (a) *Üstte*, devreden geçen I akımının şekli ve *altta*, araştırma halkası ile gözlenen voltaj pulsunun şekli. Akım pulsunun yükselme süresi 0,5 ms ve düşme süresi 9,5 ms dir. Bu nedenle alttaki şekilde (dikdörtgen pulsta) küçük bir negatif sapma olarak görülmektedir. (b) Aynı akım ve voltajların farklı amplifikasyonlarda gösterilmesi. 31

Şekil 3.3 (a) Güç kaynağı (b) Güç kaynağı üzerinde bulunan ekran 32

Şekil 3.4 Pulslu manyetik alanın biçim ve süreleri 32

Şekil 3.5 Pulslu manyetik alana bırakılan deney hayvanları 33

Şekil 3.6 Organ banyosu sistemi 34
Şekil 3.7 Organ banyosuna dikey olarak asılan şerit formundaki torasik aorta dokusu 34
Şekil 3.8 Plate'lere alınmış hücre kültürü..... 36
Şekil 3.9 Floresans mikroskopu..... 38
Şekil 3.10 Floresans mikroskopunda alınan bir Ca^{+2} sinyali görüntüsü 39
Şekil 4.1 Endotelli ve Endotelsiz damar dokularında Fenilefrin dozlarına alınan kasılma yanıtları. (A) Kontrol ve PMA uygulaması yapılmış endotelli dokuda Fenilefrine kasılma yanıtları. (B) Endoteli sıyrılmış dokuda Fenilefrin kasılma yanıtları. Deneysel ortalamaların 4 - 5 hayvandan n: 8 olarak yapılmıştır ..……...41
Şekil 4.2 Endotelli ve Endotelsiz damar dokularında KCl dozlarına alınan kasılma yanıtları. (A) Kontrol ve PMA uygulaması yapılmış endotelli dokuda KCl kasılma yanıtları. (B). Endoteli sıyrılmış dokuda KCl kasılma yanıtları. Deneysel ortalamaların 4 - 5 hayvandan n: 8 olarak yapılmıştır. 42
Şekil 4.3 Endotelli ve Endotelsiz damar dokularında H_2O_2 uygulaması ile oluşan kasılma yanıtlarının karşılaştırılması. (A) Endoteli sağlam damar dokusunda elde edilen kasılma yanıtları kontrol ve PMA grupları arasında karşılaştırılmıştır. * $p<0,05$ kontrol grubu. İstatistiksel karşılaştırma student t-testi ile yapılmıştır. Analiz, ortalama ±SEM olarak gösterilmiştir. (B). Endoteli sıyrılmış kontrol ve PMA gruplarında H_2O_2'ye kasılma yanıtları. 43
Şekil 4.4 (A) Fenilefrin 10-5 M uygulamasının ardından, yıkama yapılmadan H_2O_2 deney küvetinin içine ok ile belirtilen zamanda eklendi. (B) Endotelli dokuda PMA grubu * $p<0,05$ kontrol grubu. İstatistiksel karşılaştırma student t-testi ile yapıldı. Analiz, ortalama ±SEM olarak gösterildi. (C) Endoteli sıyrılmış kontrol ve PMA gruplarında H_2O_2'ye kasılma yanıtları..... 45
Şekil 4.5 Maximum doz KCl (120 mM) uygulamasının ardından, yıkama yapılmadan H_2O_2 deney küvetinin içine ok ile belirtilen zamanda eklenmiştir 46
Şekil 4.6 (A) PMA'nın kasılma yanıtlarına apoptotik süreçlerdeki etkisi. Dokular 40 dakika boyunca H_2O_2 ile inkübe edildiler, ardından 10-5 M Fenilefrin banyo küvetine eklendi. (B) Endotelli dokuda PMA grubu * $p<0,05$ kontrol grubu. İstatistiksel karşılaştırma student t-testi ile yapılmıştır. Analiz, ortalama ±SEM olarak gösterilmiştir. (C). Endoteli sıyrılmış kontrol ve PMA gruplarında H_2O_2'ye kasılma yanıtları 47
Şekil 4.7 (A) PMA'nın kasılma yanıtlarına apoptotik süreçlerdeki etkisi. Dokular 40 dakika boyunca H_2O_2 ile inkübe edildiler, ardından 120 mM KCl ile kasılması sağlandı. (B) Endotelli dokuda PMA grubu * $p<0,05$ kontrol grubu. İstatistiksel karşılaştırma student t-testi ile yapılmıştır. Analiz, ortalama ±SEM olarak gösterilmiştir. (C) Endoteli sıyrılmış kontrol ve PMA gruplarında H_2O_2'ye kasılma yanıtları. 49
Şekil 4.8 VDKH'lerin 1 mM H_2O_2'ye karşı sitoplazmik Ca^{+2} sinyal yanıtları. A. 30 günlük PMA'ya maruz bırakılmış hayvanlardan (koyu mavi) ve kontrollerden (kırmızı) izole edilmiş VDKH'lere 13. Frame de H_2O_2 uygulanmıştır. B. Floresans yoğunluğunun arka plana göre kat artışı. H_2O_2 uygulamasından yaklaşık 150 saniye sonra her gruptaki hücrelerden alınan floresan yoğunluğu verilerinin ortalaması alınmıştır (4 hayvandan n = 6-7 hücre)..... 51

Şekil 5.1 (75) Moleküler oksijenin (O^{-2}) bir elektron indirgenmesi olarak tanımlanan süperoksit anyonu, vasküler düz kas ve endotel hücreleri de olmak üzere gibi tüm hücre tiplerinde bir çok farklı enzim (örn., NADPH oksidaz, ksantinoksidaz, siklooksijenazlar, NO sentazlar, sitokrom P450 monooksigenazlar, mitokondrial solunum zincirinin enzimleri) tarafından üretilebilir. Süperoksit, kendiliğinden veya enzimatik olarak süperoksit dismutaz (SOD) tarafından yüksüz H_2O_2'ye indirgenir. H_2O_2 katalaz enzimi veya glutatyon peroksidaz ile su ve oksijene dönüşmesidir. Geçiş metalleri (bakır, demir) veya süperoksit anyon varlığında ise H_2O_2, Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonu vasıtasıyla yüksek reaktif hidroksil radikallerini (OH^-) oluşturur (76)..... 53

Şekil 5.2 Endotel bağımlı kasılmaların ortaya çıkmasına yol açan mekanizmalar. Zincirin başlangıç noktası önce anormal hücre içi kalsiyum artışıdır (95)..... 56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIF	Apoptoz Indükleyici-Teşvik Edici- Factor
APAF-1	Apoptotik Proteaz Aktive Etme Faktörü
ATP	Adenozin Trifosfat
B	Manyetik Alan Şiddeti
Ca^{+2}	Kalsiyum
$CaCl_2$	Kalsiyum Klorür
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
DETAUM	Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Media
dPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ELF	Düşük Frekanslı Manyetik Alan
EM	Elektromanyetik
EMA	Elektromanyetik Alan
ER	Endoplazmik Retikulum
f	Frekans
G	Gauss
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HF	Yüksek Frekans
Hz	Hertz
I	Akim Şiddeti
K	Kontrol
KCl	Potasyum Klorür
KH_2PO_4	Potasyum Dihidrojen Fosfat
LV	Level
$MgSO_4$	Magnezyum Sülfat
MHZ	Miyozin Hafif Zincir
MHZF	Miyozin Hafif Zincir Fosfataz

MHZK	Miyozin Hafif Zincir Kinazı
MW	Mikro Dalgalar
NaCl	Sodyum Klorür
$NaHCO_3$	Sodyum Hidrojen Karbonat
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
p53	Tümör Protein 53
PLC	Fosfolipaz C
PEMA	Pulslu Elektromanyetik Alanlar
PMA	Pulslu Manyetik Alan
PN	Puls Numarası
R	Yarıçapı
RF	Radyo Dalgalar
SEM	Standarde Error Mean
SERCA	Sarko/Endoplazmik Retikulum Ca+2-ATPaz
SR	Sarkoplazmik Retikulum
T	Tesla
TN	Tren Numarası
TRP	Transient Reseptör Potansiyeli
UV	Ultraviyole ışınları
VKKK	Voltaj Kapılı Kalsiyum Kanalları
VDK	Vasküler Düz Kas
VDKH	Vasküler Düz Kas Hücreleri

ÖZET

Torasik Aorta Uygulanan Pulslu Manyetik Alanın Apoptotik Etkilerinin Kasılma Parametreleri Üzerinden İncelenmesi

Programlı hücre ölümü (apoptozis) canlının kendisi tarafından programlı bir şekilde yaşlanmış, zararlı ve istenmeyen hücrelerinin enerji kullanılarak yok edilmesidir. Hücre ölümü düzenli ve kontrollü bir şekilde olmalıdır çünkü hücre ölüm bozukluğu, otoimmün hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar, iskemiye bağlı hastalıklar, insüline bağımlı tip diyabet, hepatit C infeksiyonu ve AIDS gibi bir takım hastalıklara neden olur.

Biyolojik sistemleri etkileyen farklı şiddet ve frekanslardaki manyetik alan kuvvetlerinin etkilerini anlamak için yapılan çalışmalarda pulslu manyetik alanın (PMA) hücrenin proliferasyonuna, büyüme faktörlerinin sentez ve salınımına, apoptoza etkisi gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında, deney hayvanlarına (rat) uygulanan PMA'nın vasküler sistemdeki olası apoptotik etkilerinin hücre içi Ca^{+2} konsantrasyon değişimi ve düz kas kasılma yanıtları üzerinden incelenmesi amaçlanmıştır.

İki gruba ayrılan deney hayvanlarının birinci grubu günde bir defa ve her gün aynı saatte, 1 saat boyunca PMA'ya (1,5 mT ve 40 Hz) maruz bırakıldı. İkinci grup ise kontrol grubu olarak ayrıldı. İki gruptan alınan dokular endotelli ve endotelsiz olarak organ banyosu sistemine asıldı. Dokulara elektriksel uyaran KCl, kimyasal uyaran fenilefrin ve H_2O_2 akut ve kısa dönem (40 dakika inkübasyon) şeklinde uygulanıp, kasılma yanıtlarını ölçerek hücrede moleküler düzeyde gerçekleşebilecek apoptotik değişikliklerin kasılma üzerine etkisi kontrol edildi. Ayrıca sıçanlardan alınan torasik aorta dokularından elde edilen hücre kültürü hücreleri Fura-2am floresans boya ile yüklenerek floresans mikroskopunda Ca^{+2} konsantrasyonu gözlendi.

PMA'nın etkileri bir apoptoz indükleyici H_2O_2 ile test edilerek Ca^{+2} düzeyinin PMA grubunda daha yüksek olduğu bulundu. Hem KCl hem de Fenilefrin için % kasılma değerlerinin endotelsizler de daha büyük olduğu bulundu. H_2O_2'nin 40 dakikalık inkübasyonu sonucu erken apoptoz yapılan dokularda elde edilen fenilefrin kasılma yanıtlarında da PMA grubunda artış gözlendi. Yine H_2O_2 ile 40 dakikalık erken apoptoz oluşturulan dokularda KCl uyarısında kontrol grupları için endotel varlığında kasılabilirliğin daha fazla olduğu görüldü.

Fenilefrin yanıtının bir parçasını oluşturan Inositol 1,4,5-trifosfat reseptörlerinin apoptozun kritik düzenleyicisi olabileceğini ve ilaç araştırmalarında önemli bir hedef olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Pulslu manyetik alan, apoptoz, H_2O_2, Ca^{+2}.

ABSTRACT

Investigation of Apoptotic Effects of Thoracic Aortic Pulsed Magnetic Field with Contraction Parameters

Programmed cell death (apoptosis) is the depletion of harmful, aged and unwanted cells by the organism in a programmed manner. Cell death should be regular and controlled because it causes a number of diseases such as cell death, autoimmune diseases, neurodegenerative diseases, ischemic diseases, insulin dependent type diabetes, hepatitis C infection and AIDS.

In studies to understand the effects of magnetic field forces at different intensities and frequencies affecting biological systems, apoptosis has been shown to influence the proliferation of the pulsed magnetic field (PMA), the synthesis and release of growth factors. In this thesis study, it is aimed to investigate the possible apoptotic effects of PMA applied to experimental animals (rat) in the vascular system via intracellular Ca^{2+} concentration change and smooth muscle contraction responses.

The first group of two experimental animals was exposed to PMA (1.5 mT and 40 Hz) for a one hour at the same in each day. The second group was divided into control groups. The tissues from both groups were suspended in endothelial and endothelial organ system. The tissues were treated with electrical stimulus KCl, chemical stimulant phenylephrine and H_2O_2 (acute and short term, 40 min incubation). The effect of apoptotic changes on the contraction of the cell at the molecular level was checked by measuring the contractile responses. In addition, the cell culture cells obtained from rat aortic aorta tissues were loaded with Fura-2am fluorescence dye and the concentration of Ca^{2+} in the fluorescence microscope was observed.

The effects of PMA were tested with an apoptosis-inducing H_2O_2 to find that the Ca^{2+} level was higher in the PMA group. The% contraction values for both KCl and phenylephrine were found to be greater for endothelials. Phenylephrine contraction responses in tissues subjected to early apoptosis after a 40-minute incubation of H_2O_2 also increased in the PMA group. Again, in the tissues with 40 minutes of early apoptosis with H_2O_2, the KCI stimulus was found to be more susceptible to endothelial activity for the control groups.

Inositol 1,4,5-triphosphate receptors, which form part of the phenylephrine response, are thought to be apoptosis critical regulators and may be an important target in drug studies.

Key words: Pulsed magnetic field, apoptosis, H_2O_2, Ca^{+2}.

1. GİRİŞ

Tüm canlıların yaşamı doğma, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölüm gibi kısımlardan oluşur. Canlıların temel yapı birimi olan hücrelerin gerekli ihtiyaçları karşılanmadığında hücre ölümleri meydana gelir. Bu hücre ölümleri üç tiptir; nekroz, apoptoz ve otofajik hücre ölümü. Nekroz, hasar yolu ile oluşan hücre ölümüdür ve mekanik hasar, oksijen yokluğu ve toksik maddeler etkisi ile gerçekleşir. Nekrozda apoptozdan farklı olarak hücre şişmesi ve lizis meydana gelir, enerji kullanılmaz ve ayrıca fizyolojik bir ölüm şekli değildir. Apotoz ise canlının kendisi tarafından programlı bir şekilde yaşlanmış, zararlı ve istenmeyen hücrelerinin enerji kullanılarak yok edilmesidir. Dokularda doku homeostazını oluşturmak üzere dinamik bir denge vardır. Bu denge bozulduğunda çeşitli hastalıkları da beraberinde getirir. Hücre ölümü düzenli ve kontrollü bir şekilde olmalıdır çünkü hücre ölüm bozukluğu hücre sayısında artışa ya da çok fazla hücrenin azalmasına neden olabilir buda bir takım hastalıklara neden olur. Örneğin; kanser, otoimmün hastalıkları hücre sayısındaki artışta meydana gelirken, nörodejeneratif hastalıklar, iskemiye bağlı hastalıklar, insüline bağımlı tip-2 diyabet, hepatit C infeksiyonu ve AIDS gibi hastalıklar ise çok fazla hücre kaybı olduğunda meydana gelir. Ayrıca insan embriyosunun el parmakları arasında bulunan perdelerin, buradaki hücrelerin apoptozla ölmesi sonucu kaybolduğu düşünülmektedir.

Bir organizmanın gelişimi sırasında, hücre çoğalması, farklılaşması ve hücre ölümü gibi olaylar birbiri ile dengeli olaylardır. Apoptoz çok sayıda ve çeşitte iyon, molekül, gen ve protein tarafından düzenlenir (Ca^{+2} seramid, c-myc, p53 vb.). Apoptoz, antiapoptotik ve proapoptotik proteinler arasındaki denge tarafından düzenlenir. Bcl-2 gen ailesi proteinleri (bcl-2, bcl-xL, bax, bak, bad) apoptozun düzenlenmesinde belirleyici bir role sahiptir.

Birçok kalsiyum bağlayıcı proteinin hücre canlılığı, apoptoz ve kanserin ilerlemesinde önemli rolleri bulunmuştur. Kanserin farklı tip ve evrelerinde kalsiyum bağlayıcı protein ekspresyon düzeyinin değişmesi bu proteinlerin kanser belirteci olarak kullanılabileceğini gösterir (1). Apoptoz, antiapoptotik ve proapoptotik proteinler arasındaki denge tarafından düzenlenir. Anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyeden oluşan Bcl-2 ailesi, apoptotik hücre ölümü düzenlenmesinde rol oynayan ve iyi ayırt edilmiş bir protein ailesidir. Örneğin, Bcl-2 ve Bcl-xL, bu ailenin antiapoptotik üyeleridir ve

kaspazlar (kompleks apopitozom olarak da adlandırılırlar) sitokrom C ve AIF (apoptoz indükleyici-teşvik edici- faktör) gibi mitokondriyal apoptogenik faktörlerin sitoplazmasına salınmasını önleyerek apoptozu engellerler. Sitoplazmaya girdikten sonra, sitokrom C ve AIF apoptotik değişikliklere neden olmak için hücresel proteinleri bölen kaspazı direk olarak aktive eder. Bunun aksine pro-apoptotik üyeler olan Bax ve Bak gibi protein aileleri, heterodimerizasyon aracılığı ile ölüm antagonistlerinden kaspaz salınımını tetikler ve aynı zamanda mitokondri zarlarının geçiş porları yoluyla sitoplazmaya mitokondriyal apoptogenik faktörlerin salınımını uyararak kaspaz aktivasyonuna yol açar. Böylece, proteinlerin Bcl-2 ailesi, apoptoz ortak yol içinde kritik bir yaşam-ölüm karar noktası olarak iş görür. Mitokondrinin apoptozdaki rolü ikiye ayrılır;

1) Mitokondri yüzey reseptörleri; Bcl2, Bak, Apaf-1 ve Bax.
2) Mitokondri hassasiyeti oluşturan ajanlar; seramid, oksidanlar, kaspazlar, Ca^{+2} vs.

Kaspazlar mitokondride inhibe edilirler ve kaspazlar işlevlerine göre şu şekilde sınıflandırılırlar;

1) Başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2,8,9 ve 10)
2) Etkili (efektör) kaspazlar (3,6 ve 7)
3) Enflamatuvar kaspazlar (kaspaz 1,4,5,11,12,13 ve 14)

Bcl- 2 ve Bax proteinleri mitokondri dış zar geçirgenliğini ayarlar. Bax sitozolde bulunur ve Apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır. Burada küçük delikçikler “pore” oluşumunu indükler. Böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur. Sonuçta sitokrom-C ve apoptoz-indükleyici faktör olarak bilinen AIF’ün mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar. Ayrıca Bax, apoptozun ekspresyonunu arttırır.

Sitokrom-C mitokondri iç membranında bulunan, bir elektron transport zinciri proteinidir ve apoptotik proteaz aktive etme faktörünü (APAF-1) aktive eder ve kaspasların aktive edildiği yer olan sitoplazmaya salar (2,3).

P53 apoptozu uyarıcı bir proteindir. Birçok anti-tümör ilaç, hedef olarak hücre DNA’sını seçer ve p53 seviyesini artırır. Bu aktivasyon ya hasarın tamirine ya da

apoptoza yol açar. Hücrede aşırı miktarda Bcl-2 proteini varsa ve p53 de mutasyona uğrarsa apoptoz gerçekleşemez (4).

Farklı şiddet ve frekanslardaki manyetik alan kuvvetleri biyolojik sistemleri dolaylı veya doğrudan etkilemektedir. Biyolojik sistemleri etkileyen bu kuvvetlerin etkilerini anlamak için yapılan çalışmalarda pulsu manyetik alanın (PMA) hücrenin proliferasyonuna, büyüme faktörlerinin sentez ve salınımına, programlı hücre ölümüne vb. etkisi gösterilmiştir. Ayrıca literatürde, PMA'nın kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve bu hücrelerde apoptotik süreçleri başlattığını gösteren çalışmalar mevcuttur (5-8).

Bu etkilerin altında yatan mekanizmaları açıklamaya çalışan pek çok çalışma bulunmaktadır. Örneğin Blank 1992 MA uygulamasının hücrede Na-K ATPaz aktivitesini etkilediğini göstermiştir (9).

H_2O_2 gibi apoptotik ajanların etkilerinin manyetik alan uygulanmış hücrelerde daha fazla olduğu gösterilmiş ve her iki gruba kalsiyum kanal blokörleri uygulandığında ise kontrol değerlerine yaklaştığı gözlenmiştir. Ayrıca hücrede kontrolsüz olarak artan serbest Ca^{+2} konsantrasyonunun mitokondriden salınan sitokrom c aracılığı ile kaspazı aktive ettiği ve bunun sonucunda apoptotik yolakların aktivasyona uğradığı bilinmektedir (10). Hücre memranında veya intraselüler organel membranlarında yer alan iyon kanalı/reseptörlerin dışardan uygulanan PMA gibi bir etki neticesinde açılması hücrenin o koşula adaptasyonuna veya apoptotik süreçlerin başlamasına neden olabilecektir (11).

Literatürde manyetik alanın canlılar üzerindeki olumlu ve olumsuz etkilerini gösteren birçok çalışma olmakla birlikte etki mekanizması tartışma konusu olmuştur. Bu nedenle bu tez çalışmasında, deney hayvanlarına (rat) uygulanan PMA'nın vasküler sistemdeki olası apoptotik etkilerinin hücre içi Ca^{+2} konsantrasyon değişimi ve düz kas kasılma yanıtları üzerinden incelenmesi amaçlanmıştır.

H_2O_2'nin kasılma yanıtlarını PMA ve kontrol gruplarında ölçerek endotelli ve endotelsiz dokulardaki moleküler düzeyde gerçekleşebilecek apoptotik değişikliklerin kasılma üzerine etkisi kontrol edildi.

Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu düz kasta kasılma ile birlikte pek çok sinyal yolağının aktivasyonunda ikinci haberci olarak görev almaktadır. Hücrede kontrolsüz bir şekilde artan kalsiyumun apoptozu tetiklediğini gösteren çalışmalar mevcuttur.

Ancak PMA'nın Ca^{+2} sinyallerini nasıl etkilediği net olarak bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmada in vivo olarak, PMA 'ya (1,5 mT ve 40 Hz, 30 gün, 1 saat boyunca) maruz kalmanın etkileri, vasküler düz kas hücrelerinde, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonun değişimi üzerinden ve ardından H_2O_2'in kasılma yanıtlarına etkileri akut ve kısa dönem apoptoz (40 dakika inkübasyon) olarak incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Manyetik Alan Kaynakları

Elektromanyetik spektrum doğal kaynakların yanı sıra insan yapımı kaynaklardan elde edilen alanları da içerir: X-ışınları, bir spor kazasından sonra kırık bir ekstremiteyi teşhis etmek için kullanılır. Her elektrik prizinden gelen elektrik, düşük frekanslı elektromanyetik alanlarla ilişkilendirilmiştir. TV antenleri, radyo istasyonları veya cep telefonu baz istasyonları aracılığıyla olsun, bilgi aktarmak için çeşitli yüksek frekanslı radyo dalgaları kullanılır.

2.1.1. Biot-Savart Yasası ve Helmholtz Halkaları

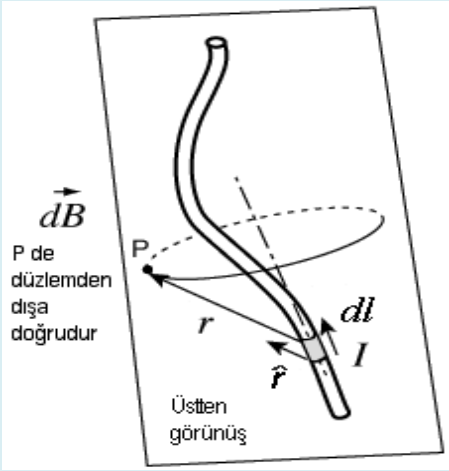
Bir telden geçen I akımının P noktasında oluşturduğu manyetik alanı ele alalım (Şek 2.1). *Idl* akım elemanı P noktasındaki manyetik alana bir $d\vec{B}$ katkısı yapar. Akım elemanının P'ye olan konum vektörü $\vec{r} = r\hat{r}$ ise, bu sonsuz küçük akım elemanı için Biot-Savart yasası;

$$d\vec{B} = \frac{\mu_o}{4\pi} \frac{Id\vec{l}x\hat{r}}{r^2} \qquad (2.1)$$

şeklindedir. $d\vec{B}$ nin yönü, $I\,d\vec{l}x\hat{r}$ vektörün çarpımının yönüyle belirlenmekte olup, her iki vektöre de dik ve şekildeki durumda sağ el kuralına göre sayfanın dışına doğrudur (Sağ elin parmakları $d\vec{l}$ 'yi $\hat{r}$ ye doğru döndürecek gibi kıvrıldığında başparmak $d\vec{B}$ nin yönünü verir.)

Bu katkının büyüklüğü Denklem 2.1'den

$$dB = \frac{\mu_o}{4\pi} \frac{Idl\sin\theta}{r^2} \qquad (2.2)$$



Şekil 2.1. Bir Idl akım elemanının bir P noktasındaki alana yaptığı katkı $d\vec{B}$ dir. $Id\vec{l}$ ile $\hat{r}$, şekil düzlemi içindeyseler, $d\vec{B}$ düzleme dik ve dışına doğrudur.

dir. Burada θ, $d\vec{l}$ ile $\hat{r}$ vektörleri arasındaki açıdır. μ_o sabitine boşluğun *geçirgenlik (permeabilite) sabiti* denir. μ_o ın SI daki değeri

$$\frac{\mu_o}{4\pi} = 1x10^{-7}\ \frac{\mathrm{T\cdot m}}{\mathrm{A}} \quad \text{veya} \quad \mu_o = 4\pi x10^{-7}\ \mathrm{T\cdot m/A}$$

dir. Hava ile boşluğun manyetik özellikleri çok yakın olduğundan aynı kabul edilebilir.

Akım dağılımının oluşturduğu manyetik alan, Denklem 2.2'nin her zaman akım dağılımının hatları üzerinden integrali alınarak hesaplanır.

$$\vec{B} = \int \frac{\mu_o}{4\pi}\frac{Id\vec{l}x\hat{r}}{r^2} \qquad (2.3)$$

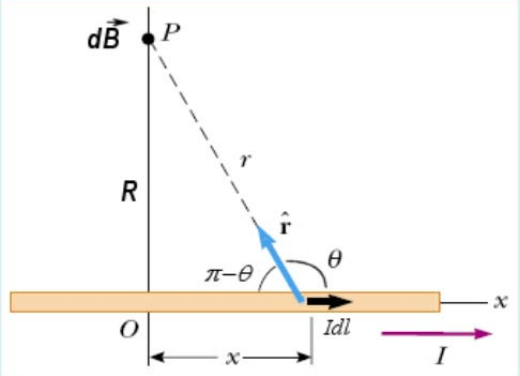
2.1.2. Uzun bir doğrusal teldeki akımın oluşturduğu manyetik alan

Tipik bir Idl akım elemanı Şekil 2.2'de görülmektedir. P noktasının telden dik uzaklığı *R* olduğuna göre bu noktadaki manyetik alana gelen $d\vec{B}$ katkısını Denklem 2.1 verir. Vektörel çarpıma sağ el kuralını uygularsak $d\vec{B}$ nin sayfaya dik ve dışa doğru olduğunu görürüz.

$d\vec{B}$ nin büyüklüğü ise Denklem 2.2 ile verilir. $r^2 = x^2 + R^2$ ve $Idl = Idx$ olduğundan

$$dB = \frac{\mu_o}{4\pi}\frac{Idx\sin\theta}{x^2+R^2} = \frac{\mu_o}{4\pi}\frac{IRdx}{\left(x^2+R^2\right)^{3/2}}$$

olur. Şekil 2.2'den $sin\theta = sin(\pi-\theta) = R/(x^2+R^2)^{1/2}$ olduğunu görebilirsiniz.



Şekil 2.2. Bir *I* akımı taşıyan uzun bir doğrusal tel. Bir Idl akım elemanı, P noktasında manyetik alana bir $d\vec{B}$ katkısı yapar. $d\vec{B}$ nin yönü şekil düzleminden dışarıya doğrudur.

$$B = \int dB = \frac{\mu_o}{4\pi}\int_{-\infty}^{+\infty}\frac{IR}{\left(x^2+R^2\right)^{3/2}}dx$$

İntegrali Şekil 2.2'nin öngördüğü gibi $x=Rcot(\pi-\theta)$ dönüşümünü yaparak çözdüğümüzde sonuç:

$$B = \frac{\mu_o IR}{4\pi}\left[\frac{x}{R^2\left(x^2+R^2\right)^{1/2}}\right]_{-\infty}^{+\infty} = \frac{\mu_o IR}{4\pi}\,\frac{2}{R^2}$$

Sadeleştirerek, I akımı geçen uzun bir doğrusal telden R uzaklığındaki bir noktada manyetik alanın büyüklüğünü bulunabilir.

$$B = \frac{\mu_o I}{2\pi R} \qquad (2.4)$$

Alanın yönü ise tel ile noktanın tanımlandığı düzleme dik olacak şekilde sağ el kuralıyla belirlenir.

2.1.3. Bir Akım Halkasının Manyetik Alanı

Biot-Savart yasasının bir diğer uygulaması olarak yarıçapı R olan ve bir I akımı taşıyan dairesel bir halkanın, ekseni üzerindeki noktalarda oluşturduğu manyetik alan hesaplanırsa; halkanın her elemanı için $Id\vec{l}$ ile $\hat{r}$ birim vektörü bir birine diktir. Bu durumda $d\vec{B}$ nin büyüklüğü Denklem 2.3'de θ= 90° ve sinθ= 1 konarak bulunur.

$$dB = \frac{\mu_o Idl}{4\pi r^2}$$

Her bir akım elemanı için $d\vec{B}$ lerin büyüklükleri aynı fakat yönleri değişir. $d\vec{B}$ yi eksen boyunca $dB_x = dB\cos\phi$ ve eksene dik olan $dB_\perp = dB\sin\phi$ bileşenlerine ayırırız. Problemin simetrisinden $dB_\perp$ bileşenlerinin halka boyunca toplanarak ya da integral alınarak sıfır vereceği Şekil 2.3'ten görülmektedir. Artık yalnız x ekseni üzerindeki dB_x bileşeninin integralini almamız gerekmektedir. Öyleyse eksen üzerindeki noktalarda, manyetik alan eksen boyunca olup bileşeni

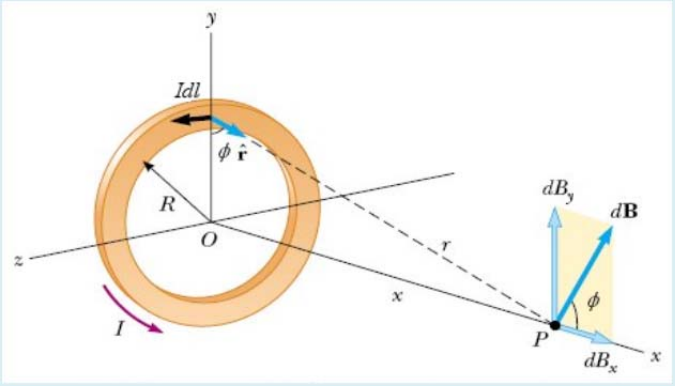
$$B_x = \int dB_x = \int \frac{\mu_o Idl\cos\phi}{4\pi(x^2+R^2)}$$

ile bulunacaktır. Burada $r^2 = R^2 + x^2$ dir.

Halka boyunca dl'nin integralini alırken integraldeki her çarpan sabit kalacağından dışarıya çıkarılınca geriye

$$\int dl = l = 2\pi R$$

kalır; bu da halkının çevresidir.



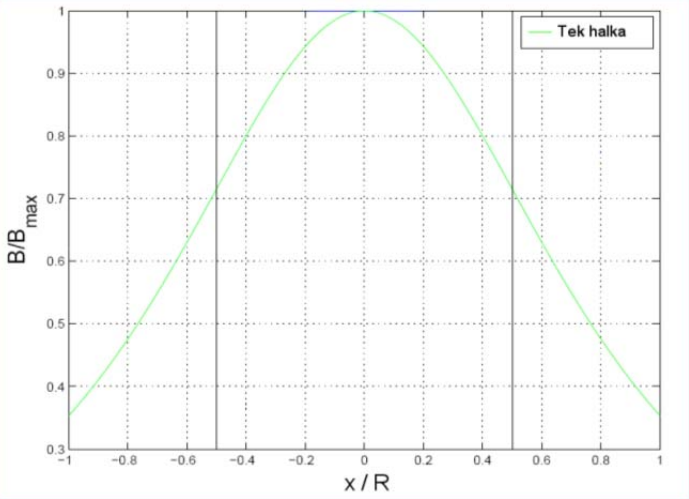
Şekil 2.3. Bir dairesel halkanın akım elemanı halkanın ekseni üzerindeki P noktasında alana bir $d\vec{B}$ katkısı yapar. $Id\vec{l}$ ile $\hat{r}$ bir birine diktir.

Cosϕ'yi Şekil 2.4'ün geometrisinden yararlanarak R ve x cinsinden bulabiliriz:

$$\cos\phi = \frac{R}{r} = \frac{R}{(x^2 + R^2)^{1/2}}$$

Böylece bulunanları yerine koyarak B_x için

$$B_x = \frac{\mu_o I R^2}{2(x^2 + R^2)^{3/2}} \qquad (2.5)$$



Şekil 2.4. R yarıçaplı bir dairesel halkanın merkezinden geçen x ekseni boyunca oluşan manyetik alan her iki tarafta simetriktir.

bulunur. B_x manyetik alanı halkanın (merkezinin, x= 0) her iki tarafında ($+x$ ve $-x$ taraflarında) simetrik olarak değişmektedir (Şekil 2.4). Halkanın ekseni üzerindeki noktalar arasında alanın büyüklüğü x = 0'da, yani halkanın merkezinde maksimum değerini alır (12).

$x = 0$ için (halkanın merkezinde) $\qquad B_x = \frac{\mu_o I}{2R}$

2.1.4. Helmholtz Halkaları

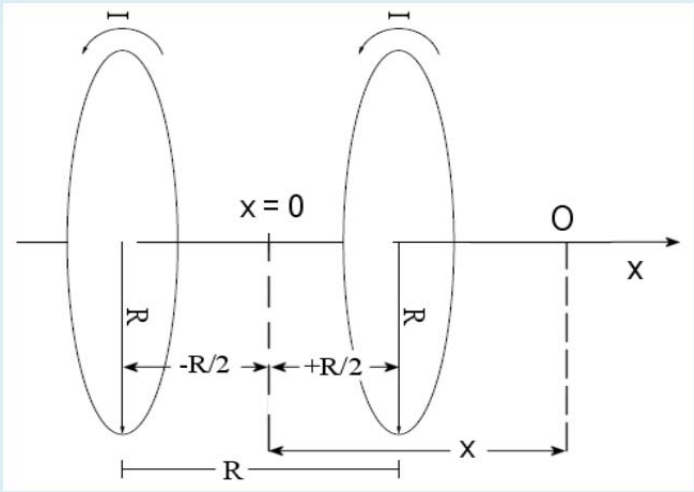
Biyolojik sistemlere elektromanyetik alanların etkilerini araştırmak için düzgün elektromanyetik alan üreten sistemler kullanılmalıdır. Bu sistemlere örnek olarak Helmholtz halkaları çifti verilebilir. Genişçe bir uzay parçasında düzgün manyetik alan elde etmek üzere geliştirilen basit araçlardan biri de Helmholtz Halkaları denilen düzenektir. Helmholtz halkaları, Alman fizikçi Hermann Von Helmholtz'un adını almıştır. Birbirine paralel konumlandırılmış iki özdeş manyetik sarmaldan (bobin) oluşur ve merkezleri aynı x-eksende hizalanmıştır (13). İki bobin, Şekil 2.6'da gösterildiği gibi, bir ayna görüntüsü gibi yarıçapa eşit bir mesafe ile ayrılır. Akım, iki bobinin aynı yönünde geçtiği zaman, bobin içindeki üç boyutlu bir alanda eşit bir manyetik alan oluşturur. İki elektromanyetik bobin aynı olduğu için, ayırma mesafesi bobin yarıçapına eşit olduğunda, tek biçimli manyetik alan elde edilir.

Şekil 2.5'te görüldüğü gibi, R yarıçaplı çemberden (tek sarımlı halka) geçen akımın eksen üzerinde x kadar uzaklıkta meydana getirdiği $\vec{B}$ alanı eksene paralel olup büyüklüğü

$$B_x = \frac{\mu_o I R^2}{2(R^2 + x^2)^{3/2}}$$

dir. Halka sayısı N olursa x ekseninde oluşacak manyetik alanın büyüklüğü de N katına çıkacaktır, yani $B_I = NB_{//}$ olacaktır. N sarımlı iki halkanın O noktasında meydana getirdikleri manyetik alanların toplamı ise,

$$B = B_1 + B_2 = \frac{N\mu_o I R^2}{2}\left[\frac{1}{\left[R^2 + (\frac{R}{2} + x)^2\right]^{3/2}} + \frac{1}{\left[R^2 + (\frac{R}{2} - x)^2\right]^{3/2}}\right]$$



Şekil 2.5. Aralarındaki uzaklık yarıçap (R) kadar olan Helmoltz halkalarının ortasından (x= 0) itibaren değişik noktalarda oluşan manyetik alan.

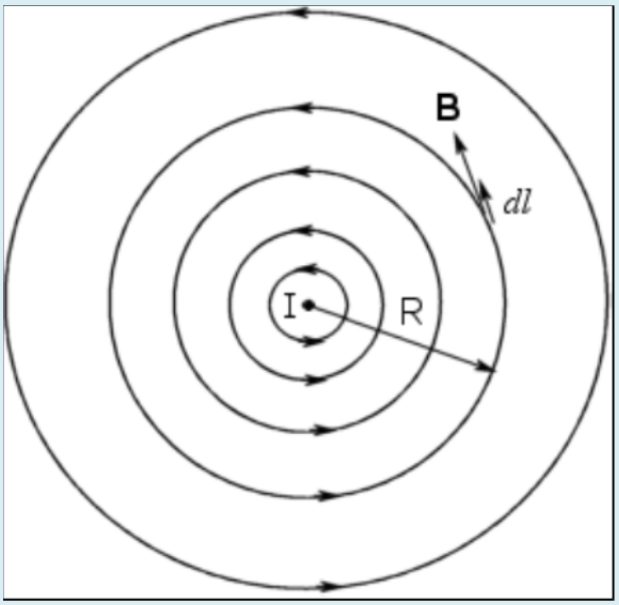
olur.

2.2. Amper Yasası ve Solenoid

Biyolojik sistemler için düzgün manyetik alan üreten sistemlerden bir diğeri de solenoid sistemleridir.

Bir I akımı taşıyan uzun bir doğrusal telin kendisinden R uzaklığında oluşturduğu manyetik alanın büyüklüğü Denklem 2.5 ile verilir.

$$B = \frac{\mu_o I}{2\pi R} \rightarrow B_x(2\pi R) = \mu_o I$$



Şekil 2.6. Akım taşıyan uzun bir doğrusal telin oluşturduğu manyetik alanın çizgileri teli çevreler. Çember yolun her noktasında $\vec{B}$ ile $d\vec{l}$ paraleldir.

Manyetik alan çizgileri teli çevreler (Şekil 2.6). Manyetik alanın çevreleme özelliği ile akımın kapalı bir yol çizgisinden geçmesi arasındaki ilişki, *Amper yasası* denilen genel bir sonuçla nicel olarak ifade edilebilir. Durumu Şekil 2.7'deki gibi basit çember yol için göstermek amacıyla bu kapalı yol üzerindeki sonsuz küçük bir $d\vec{l}$ yerdeğiştirmesi alalım. Yol üzerindeki bir noktada bunun, $\vec{B}$ manyetik alanıyla skaler olarak çarpıp, bu $\vec{B}.d\vec{l}$ katkılarını çember boyunca toplayarak $\vec{B}$ nin çemberimiz üzerinden bir kapalı çizgi integralini elde edelim:

$$\oint \vec{B} \,.\, d\vec{l}$$

Şekil 2.8'deki durum için $\vec{B}$ ile $d\vec{l}$ nin birbirine paralel olduklarını görüyoruz. Böylece skaler çarpım yalnızca büyüklüklerin çarpımı olur:

$$\vec{B} \cdot d\vec{l} = Bdl\cos\theta = B \cdot dl$$

Dahası manyetik alanın büyüklüğü çember üzerindeki her noktada aynı olduğundan *B* integralin dışına alınabilir. Dolayısı ile *dl*'nin çember boyunca integrali $2\pi R$ vereceğinden

$$\oint \overrightarrow{B} \cdot d\vec{l} = \oint B \cdot dl = B\oint dl = B(2\pi R)$$

elde ederiz. Denklem 2.5'ten ise $B(2\pi R) = \mu_o I$ yazılabilir. Böylece Şekil 2.8'de gösterilen çember yol için $\vec{B}$ nin kapalı çizgi integrali yalnızca bu yoldan geçen *I* akımına ve geçiricilik (geçirgenlik) sabiti olan μ_o a bağlı olur.

$$\oint \vec{B} \cdot d\vec{l} = \mu_o I \qquad (2.7)$$

Bu sonuç çemberin yarıçapından bağımsızdır. Akımın geçmediği yol için

$$\oint \vec{B} \cdot d\vec{l} = 0 \qquad (2.8)$$

olmaktadır.

2.2.1. Sonsuz Uzun Bir Solenoid Içindeki Manyetik Alan

Uzunluğu çapından çok büyük olan silindirik bir solenoidi ele alalım (Şekil 2.7). Uzunluğu L_o olan *N* sarımlı bir solenoidin birim uzunluk başına sarım sayısı

$$n = \frac{N}{L_o} \qquad (2.10)$$

dır. Solenoid içindeki manyetik alanın abcd yolu boyunca çizgi integrali (Şekil 2.8)

$$\oint \vec{B} \cdot d\vec{l} = \int_a^b B \cdot dl = B\int_a^b dl = BL$$

dir. Burada L, ab kenarının uzunluğudur. Birim uzunluk başına sarım sayısı n olan bir solenoidin toplam sarım sayısı nL'dir. Her bir sarım I akımı taşıdığından tüm kapalı yolu geçen net akımı

$$\sum i = nLI$$

olarak yazarız. Bu sonuçları Amper Yasasında yerine koyarak

$$\oint \vec{B} \cdot d\vec{l} = BL = \mu_o nLI$$

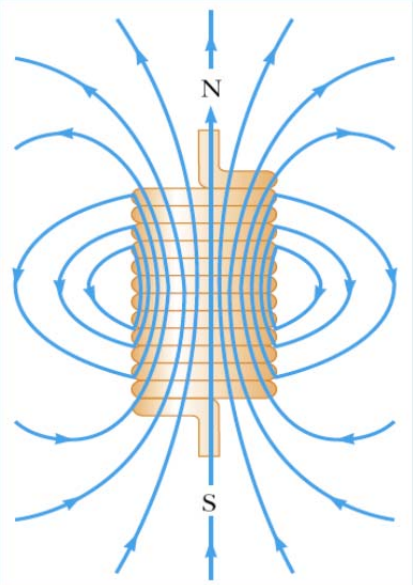
ya da

$$B = \mu_o nI = \frac{\mu_o NI}{L_o} \qquad (2.11)$$

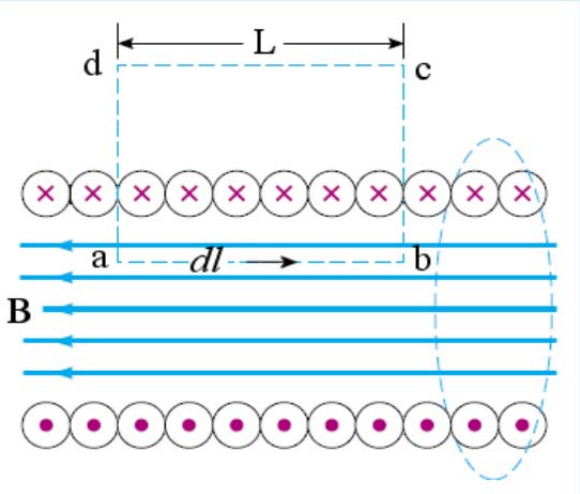
ve uçlardaki alan

$$B = \frac{1}{2}\mu_o nI = \frac{\mu_o NI}{2L_o} \qquad (2.12)$$

olarak elde edilir.



Şekil 2.7. Sık sarımlı L_o uzunluğundaki bir solenoid içindeki alan

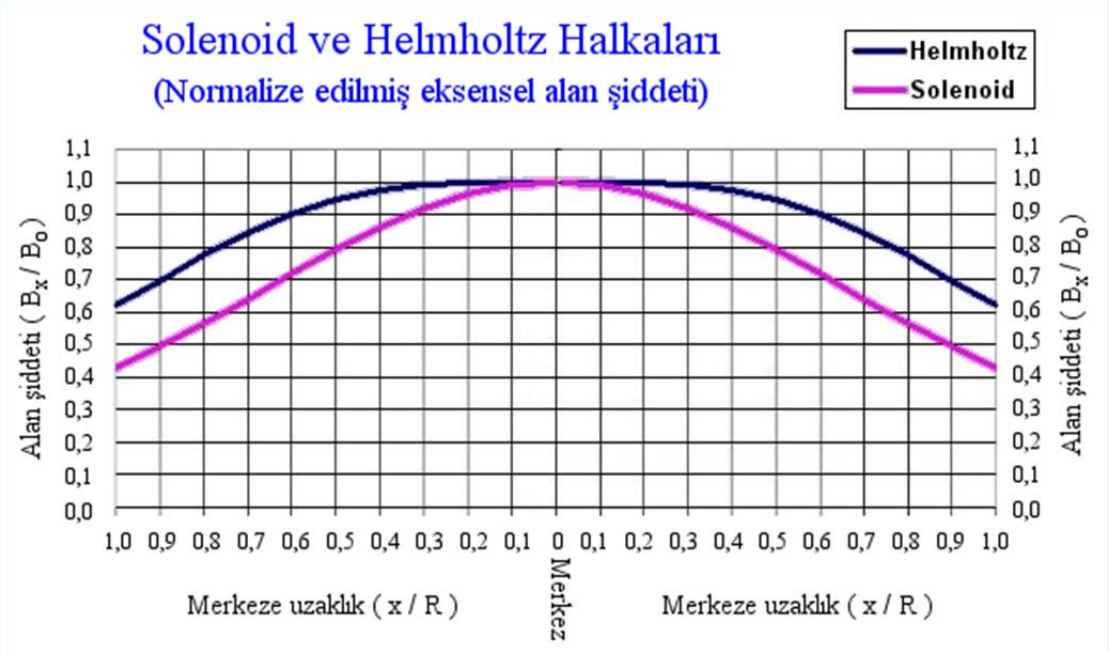


Şekil 2.8. İdeal bir solenoidin akım dağılımı bir yüzey akımına eşdeğerdir.

2.3. Solenoid ve Helmholtz Halkalarıyla Elde Edilen Manyetik Alanların Karşılaştırılması

Şekil 2.9'da, aralarındaki uzaklık yarıçap (R) kadar olan bir Helmholtz halka çifti ve uzunluğu yarıçapı kadar (L=R) olan bir solenoid içinde meydana gelen manyetik alanların değişimleri görülmektedir. Başlangıç noktaları, halkalar arasındaki uzaklığın orta noktası ve solenoidin orta noktasıdır. x= 0 noktalarında, yani merkezlerde manyetik

alan maksimum (B_o) dır. Bu iki sistem içindeki alan x= 0'a göre simetriktir. Örneğin x ten sağa doğru, ilerlenirse (şekilde bu mesafe yarıçapın katları cinsinden x/R verilmektedir), B_x manyetik alanı küçülmektedir. x= ± $R/2$ noktalarında Helmholtz halkaları sisteminde manyetik alan x= 0 daki alanın %95'ine düşerken, solenoidte %80'ine düşmektedir (12).



Şekil 2.9. Helmholtz halkaları ve solonoid içinde, merkezdeki eksende meydana gelen manyetik alanın, orta noktalardan itibaren (x) değişmesi. Aralarındaki uzaklık Helmholtz halkalarının yarıçapına (R) eşittir. Solenoidin uzunluğu da yarıçap (L=R) kadardır.

2.4. Elektromanyetik alanların Biyolojik Sistemlere Etkisi

Çeşitli çalışmalar, düşük frekanslı düşük enerjili pulslu manyetik alan (PMA)'ların insan vücudundaki farklı işlevsel değişiklikleri rapor eden biyolojik etkilerini araştırdı. Pek çok çalışma, PMA indüklü biyofizik uyarıları tanımlayarak, farmakolojik tedavilere alternatif tedaviler bulmayı amaçlamıştır (14-17).

Artan sayıda çalışma periferik ve / veya merkezi sinir sistemindeki hücreler ve / veya dokular için kullanılan PMA'ların biyolojik etkilerini göstermiştir. Biyofiziksel açıdan bakıldığında, PMA'lar, manyetik alanların şiddeti, frekans ve puls süresi gibi farklı parametrelerle karakterize edilir. Mevcut incelemede analiz edilen çalışmalar, 0,1 ile 4,5 mT arasında bir şiddet aralığına ve 10 ila 120 Hz frekans aralığına sahiptir. PMA maruziyetinin, kıkırdağı ve kemik metabolizmasını modüle etme, kondrosit ve/veya

osteoblast hücre çoğalmasını uyarma ve hücre dışı matris bileşenlerin sentezi üzerinde etkili olabileceği bildirilmiştir (18). PMA'lar tarafından indüklenen kondrosit ve/veya osteoblast hücre proliferasyonunun uyarılması sonucu, kırık iyileşmesinin tedavisinde pozitif bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (19). Özellikle, osteogenezis üzerine etkili gözlemlenen bir yarar, PMA'ların hücre proliferasyonunu stimüle ettiğini ve osteoblastogenezi indüklediğini ve osteoblastların dienfasyonunu tetiklediğine ilişkin gözlem üzerine rapor edilmiştir (20). Eklem hastalıklarına ek olarak, PMA'ların yararları manyetik alanların tümör büyümesini ve proliferasyonunu azalttığı kanser gibi çeşitli patolojik koşulların bolluğunda araştırılmıştır (21,22). Çeşitli tümör hücrelerindeki PMA'ların NF-kB stimülasyonunu ve hücre proliferasyonunu azaltabildiği ve p53 aktivasyonunu, sitotoksisitesini ve apoptozu arttırdığı bildirilmiştir (23). Dahası, PMA tedavisi postoperatif ağrı ve narkotik kullanımını hemen postoperatif dönemde yara yatağında endojen IL-1β içeren bir mekanizma ile azaltmıştır (24,25). Hipoksi ile ilişkili koşullardaki PMA'ya maruz kalmanın faydası, insan böbrek proksimal tübüler hücrelerinin hipoksi/reoksijenasyon kaynaklı ölmesini, hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin baskılanması yoluyla inhibe ederek bulunmuştur (26). Dahası, manyetik alanların iskemik hasar öncesi, sırasında ve öksürük hasarı uygulandığında, kalbi iskemi/reperfüzyona bağlı kardiyak kasılma fonksiyonsuzluk ve kalp hasarına karşı koruduğu gösterilmiştir

PMA’nın fiziksel etkisi dokuların manyetik özelliklerine bağlıdır. Canlı sistemlerde dokular genel olarak diamanyetik ve paramanyetik özelliğe sahiptir.

Konuyu özetlersek, maddeler manyetik alınganlıklarına (X) göre üçe ayrılırlar:

- -Dia manyetik maddeler (Manyetik alınganlık -1 ile 0 arasındadır).
- -Para manyetik maddeler (Manyetik alınganlık 0 ile 0,01 arasındadır).
- -Ferro manyetik maddeler (Manyetik alınganlık > 0,01)

Bir maddenin manyetik alan hassasiyeti, o maddenin manyetik alan içindeki davranışını tanımlar. Bu maddelerin eksternal bir manyetik alan içindeki yanıtları sonucunda manyetik polarizasyon oluşur (m). Bu manyetik polarizasyon, birim hacim başına manyetik dipol moment olarak ölçülür. Manyetik polarizasyonun gücü lokal ve eksternal uygulanan manyetik alan H ve manyetik alınganlık X ile orantılıdır: $m= X \cdot H$

Bütün manyetik alanlar manyetik akı yoğunluğu ile ilişkilidir:

$B=\mu_o \cdot (H+m)$ (1.4)

(μ_o= Boşluğun manyetik geçirgenliği)

İnsan vücudundaki dokuların manyetik alınganlığı ise $-10^{-5}<X<10^{-5}$ aralığında değişmektedir.

Bu durumda manyetik alanın canlı dokuda önemli bir etkisi olmayacağı öngörülebilir.

Ohm Kanununa göre, bir iletkene elektrik alan uygulanırsa akıma neden olur;

$$J=\sigma \cdot E \qquad (1.5)$$

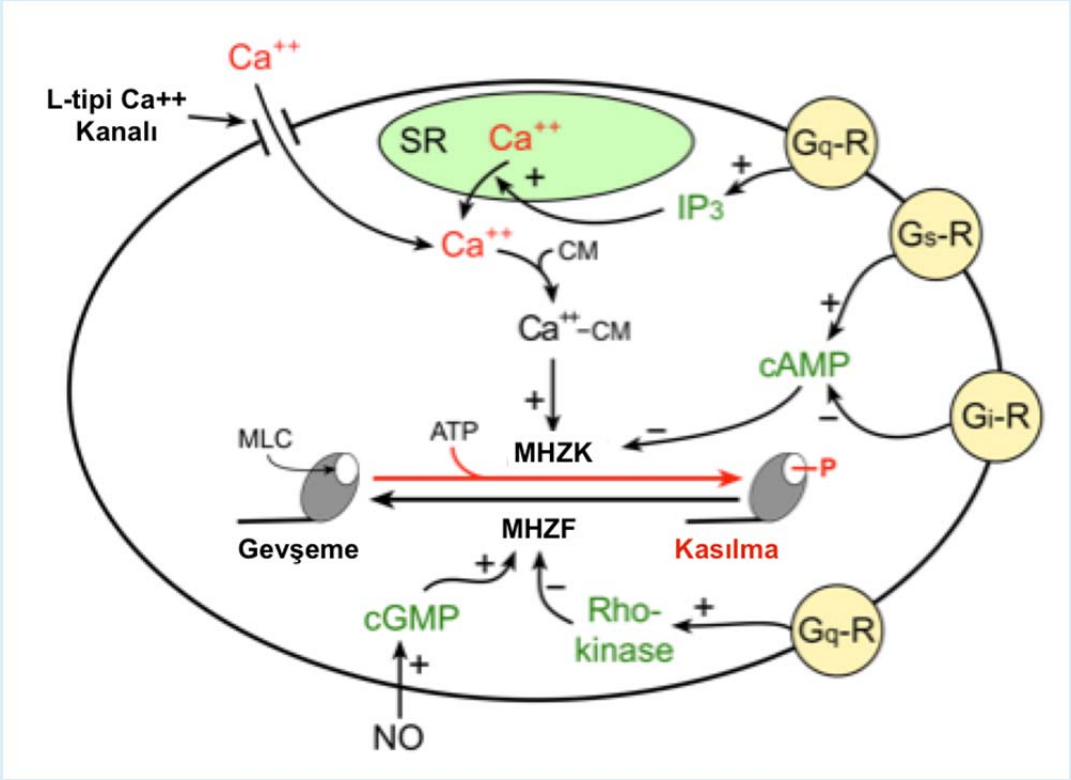
Eğer manyetik alan B uygulanan doku v hızıyla hareket ediyorsa, dokudaki elektrik akımına ek olarak (v x B) ifadesi eklenir:

$$J=\sigma (\mathbf{E+v \times B}) \qquad (1.6)$$

(**v x B**) ifadesi hareket indüklü elektrik alandır ve nöronal iletim, biyo potansiyeller gibi fizyolojik elektrik sinyallerini bozacak biyolojik etkileri vardır. Maxwell'in 3. Eşitliğine göre, $\nabla xE=-\partial B/\partial t$ zamanla değişen manyetik alan ($\partial B/\partial t$) elektrik alanın oluşmasını sağlar. Bu gradiyent indüklü elektrik alanların yeterince yüksek miktarları sinir ve kasları uyarırken, kalp uyarımına ve hatta ventriküler fibrilasyona neden olabilmektir (27).

Ancak PMA'nın etki mekanizmasının anlaşılabilmesi için bu etkiler göz önünde bulundurularak hücresel boyutta ve hücredeki sinyal yolakları üzerinden araştırılması gerekmektedir. Bu çalışmada ratlarda PMA'nın etkisi, vasküler düz kas hücrelerinde Ca^{+2} homeostazındaki olası değişimler aracılığıyla bakılacaktır.

Vasküler düz kasın ana fonksiyonu düz kasın tonusunu (gerimini) ayarlayarak damarın iç çap kontrolünü sağlamaktır. Kasılma ve gevşeme ile damar hacmini ve bölgesel kan basıncını düzenler. Damardaki fazla kasılma damar sertliğine, vazokonstriksiyona ve hipertansiyona, fazla gevşeme ise vasodilasyona ve hipotansiyona neden olur. Vasküler düz kas kasılması mekanik şekilde damarın gerilmesi ile düz kas hücre membranının elektriksel depolarizasyonu sonucunda voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarının (L-tipi Ca^{+2} kanalları) açılması ve hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak ve ayrıca G protein kenetli reseptör aktivasyonu sonucunda oluşabilir. Klabunde R.E'nin Cardiovascular Physiology Concepts isimli web sitesinde de gösterildiği gibi (Şekil 2.10) bu yolakların ortak özellikleri hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun düzenlenmesinde rol oynamalarıdır.



Şekil 2.10. Düz kas kasılmasında rol oynayan proteinler ve sinyal yolakları (28).

Tüm bu mekanizmaların düzgün bir şekilde çalışması için hücre içi iyon konsantrasyonlarının hücrenin fizyolojik sınırlarında tutulması gerekir. Özellikle sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonundaki artma hücre için önemli bir ikinci haberci ve hatta bir sinyal transduseri olarak görev alır. Ayrıca voltaj kapılı Ca^{+2} kanalı ile veya endo/sarkoplazmik retikulumdan sitoplazmaya çıkacak serbest Ca^{+2}'un Ca^{+2} indüklü Ca^{+2} salınımı prosesi ile kendi salınımını tetikleyebildiği bir durumda sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonunun fizyolojik limitler içinde kalması daha önemli bir hal almaktadır (29).

PMA uygulamasının hücre membranındaki voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları üzerine etkisinin de gösterilmiş olması (30), vasküler düz kasta PMA aracılı Ca^{+2} hemostazına etkilerinin ayrıntılı olarak araştırılmasını gerekli kılmaktadır.

2.5. Tarihçe

Apoptoz eski bir yunan terimi olarak "apo" (ayrı) ve "ptozis" (düşen) yaprak düşümü anlamına gelir. Apoptoz terimi, ilk kez Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972

yılında kullanılmıştır (31). Apoptoz teorik olarak, genetik faktörlerle ya da hücre dışı lezyonlar ile indüklenen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizması ile hücre ölümünü kontrol eden aktif bir süreçtir ve hücrenin intiharı olarak da tanımlanabilir (32). Apoptoz, çeşitli biyolojik olaylarda farklı hücre tiplerinin tahribi sırasında spesifik hücrelerin ortadan kaldırıldığı fizyolojik bir süreçtir (33). Ölüm (apoptozis) ve yeniden yapım (mitozis) dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge vardır. Bu denge bozulduğunda çeşitli hastalıkları da beraberinde getirir.

2.6. Pulslu Manyetik Alan ve Apoptoz

Farklı şiddet ve frekanslarda maruz kalınan manyetik alanlar biyolojik sistemleri dolaylı veya doğrudan etkilemektedir. Pulsu manyetik alanın etkilerini anlamak için yapılan çalışmalarda manyetik alanın sinir rejenerasyonunu, sinir büyümesini ve kalp işlevini etkilediği gösterilmiştir (34-38). Ayrıca manyetik alanın in vivo/in situ uygulandığı çalışmalarda manyetik alanın kan damarlarının çapını ve damar tonusunu etkilediği gözlenmiştir. Örneğin rat spinotrapezius kası kılcal damarlarında in situ statik manyetik alanın damar yarıçapını etkilediği ve damar tonusunun bu değişime göre düzenlendiği bildirilmiştir (39). Yine in vivo olarak tavşanlarda yapılan deneylerde statik manyetik alanın lokal olarak kulak lobuna uygulanması ile bu bölgedeki arteriyel kan basıncının değiştiği bildirilmiştir (40). Yine aynı çalışmada Ca^{+2} kanal blokörü olan nikardipin uygulanarak hipotensif ve vazodilatör etkiler, nitrik oksit sentaz blokörü olan L-NAME kullanılarak hipertensif ve vazokonstriktif etkiler tetiklenmiştir. Manyetik alan damar düz kas hücrelerinde nikardipinin neden olduğu vazodilatasyonu arttırmış ve azalan kan basıncını düzenlemiştir. Ayrıca nitrik oksit sentaz (NOS) inhibisyonu ile oluşan kan basıncındaki artışı da baskılamıştır. Literatürde, PMA'nın kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini ve bu hücrelerde apoptotik süreçleri başlattığını gösteren çalışmalar mevcuttur (41-44).

Bu etkilerin altında yatan mekanizmaları açıklamaya çalışan pek çok çalışma bulunmaktadır. Örneğin Grassi ve ark. (45) çalıştıkları kültür hücrelerine 3-4 gün manyetik alan uygulamış ve yaptıkları elektrofizyolojik ölçümlerde kanal akımlarının ve kanal protein expresyonunun kontrole göre arttığını gözlemişlerdir. H_2O_2 gibi apoptotik ajanların etkilerinin manyetik alan uygulanmış hücrelerde daha fazla olduğu

gösterilmiş ve her iki gruba kalsiyum kanal blokörleri uygulandığında ise kontrol değerlerine yaklaştığı gözlenmiştir. Ayrıca hücrede kontrolsüz olarak artan serbest Ca^{+2} konsantrasyonunun mitokondriden salınan sitokrom c aracılığı ile kaspazı aktive ettiği ve bunun sonucunda apoptotik yolakların aktivasyona uğradığı bilinmektedir (46).

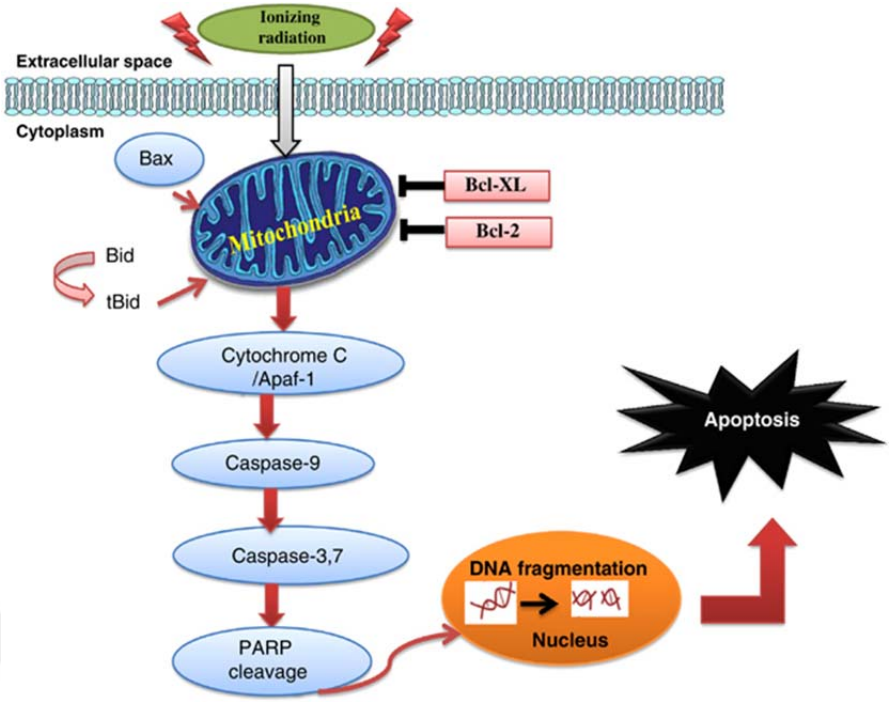
Düşük frekanslı manyetik alanınsa pek çok doku ve hücrede voltaj kapılı kalsiyum kanallarını (VKKK) aktive ettiği gösterilmiştir (47). Uygulama ile birlikte sitoplazmada çok hızlı bir şekilde Ca^{+2} konsantrasyonunun artmış olduğunun gösterilmiş olması (48) manyetik alanın VKKK üzerinde bazı regülatör etkileşimler üzerinden değil, fakat doğrudan manyetik alan uygulamasının plazma membranı üzerindeki VKKK'yı uyardığı yönündedir (49,50).

Bu çalışmalar dikkatlice incelendiğinde manyetik alanın hücrede Ca^{+2} dinamiklerini düzenleyen mekanizmalar üzerinde doğrudan (Ca^{+2} kanalları gibi) veya dolaylı olarak (NOS aktivitesi gibi) etkisi olduğu gözlenmektedir. Hücre memranındaki veya intraselüler organel membranlarında yer alan iyon kanalı/reseptörlerin dışardan gelecek PMA gibi etkiler neticesinde açılması hücrenin o koşula adaptasyonuna veya apoptotik süreçlerin başlamasına neden olabilecektir (51).

PMA uygulamasının, gen ekspresyon seviyelerini değiştirdiği çalışmalar literatürde mevcuttur. Örneğin; düşük frekanslı PMA uygulamasının tendon hücrelerinde tendon spesifik scleraxis ve tip I kollajen gen ekspresyonlarını arttırdığı ve dolayısıyla bu uygulamanın tenosit aktivasyonunu olumlu yönde etkilediği (52), ovariektomize sıçanlarda bir osteoklast marker'ı olan karbonik anhidraz izoenzim II (CAII) mRNA ekspresyonu üzerinde inhibe edici etki göstererek bu yolağı regüle ettiği, insan hücrelerinde inflamasyon yolak marker'ı genlerin ekspresyon seviyelerini modüle ettiği (53), yine PMA'nın ovariektomize sıçanlarda kıkırdak apoptoz sinyalizasyon yolaklarına etkisinin araştırıldığı çalışmada ise apoptoz Xlinked inhibitorün (XIAP) ve Bax'ın mRNA ekspresyonunu regüle ettiği gösterilmiştir (54). PMA' nın etkisinin pluripotent embriyonik kök hücre türevli nöral projenitör hücreler üzerinde incelendiği çalışmada, PMA' nın bu hücrelerde apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyesini kısa süreliğine değiştirse de bu değişikliklerin fizyolojik düzeyde bir yansıması gözlenmemiştir.

2.7. Apoptoz

Tüm canlıların yaşamı doğma, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölüm gibi kısımlardan oluşur. Canlıların temel yapı birimi olan hücrelerin gerekli ihtiyaçları karşılanmadığında hücre ölümleri meydana gelir. Bu hücre ölümleri üç tiptir; nekroz, apoptoz ve otofajik hücre ölümü. Nekroz, hasar yolu ile oluşan hücre ölümüdür ve mekanik hasar, oksijen yokluğu ve toksik maddeler etkisi ile gerçekleşir. Nekrozda apoptozdan farklı olarak hücre şişmesi ve lizis meydana gelir, enerji kullanılmaz ve ayrıca fizyolojik bir ölüm şekli değildir. Apotoz veya Apoptozis ise canlının kendisi tarafından programlı bir şekilde yaşlanmış, zararlı ve istenmeyen hücrelerinin enerji kullanılarak yok edilmesidir. Apoptoz eski bir yunan terimi olarak "apo" (ayrı) ve "ptozis" (düşen) yaprak düşümü anlamına gelir. Apoptozis terimi, ilk kez Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmıştır (55). Apoptoz teorik olarak, genetik faktörlerle yada hücre dışı lezyonlar ile indüklenen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizması ile hücre ölümünü kontrol eden aktif bir süreçtir ve hücrenin intiharı olarak da tanımlanabilir (56). Apoptoz, çeşitli biyolojik olaylarda farklı hücre tiplerinin tahribi sırasında spesifik hücrelerin ortadan kaldırıldığı fizyolojik bir süreçtir (57). Ölüm (apoptozis) ve yeniden yapım (mitozis) dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge vardır. Bu denge bozulduğunda çeşitli hastalıkları da beraberinde getirir. Hücre ölümü düzenli ve kontrollü bir şekilde olmalıdır çünkü hücre ölüm bozukluğu hücre sayısında artışa yada çok fazla hücrenin azalmasına neden olabilir buda bir takım hastalıklara neden olur, örneğin; kanser, otoimmün hastalıkları hücre sayısındaki artışta meydana gelirken, nörodejeneratif hastalıklar, iskemiye bağlı hastalıklar, insüline bağımlı tip diyabet, hepatit C infeksiyonu ve AIDS gibi hastalıklar ise çok fazla hücre kaybı olduğunda meydana gelir. Ayrıca insan embriyosunun el parmakları arasında bulunan perdelerin, buradaki hücrelerin apoptozla ölmesi sonucu kaybolduğu düşünülmektedir. Hücrede apoptotik süreçlerin tetiklenme mekanizmasını şekil 2.11'de gösterilmiştir. Şekilde apoptotik süreci başlatan iyonize radyasyon gibi oksidatif stres, uv, x ışınları, kemoterapi ajanları ve serbest radikaller diğer pek çok etmenin de apoptotik süreçleri etkileyebildiği bilinmektedir.



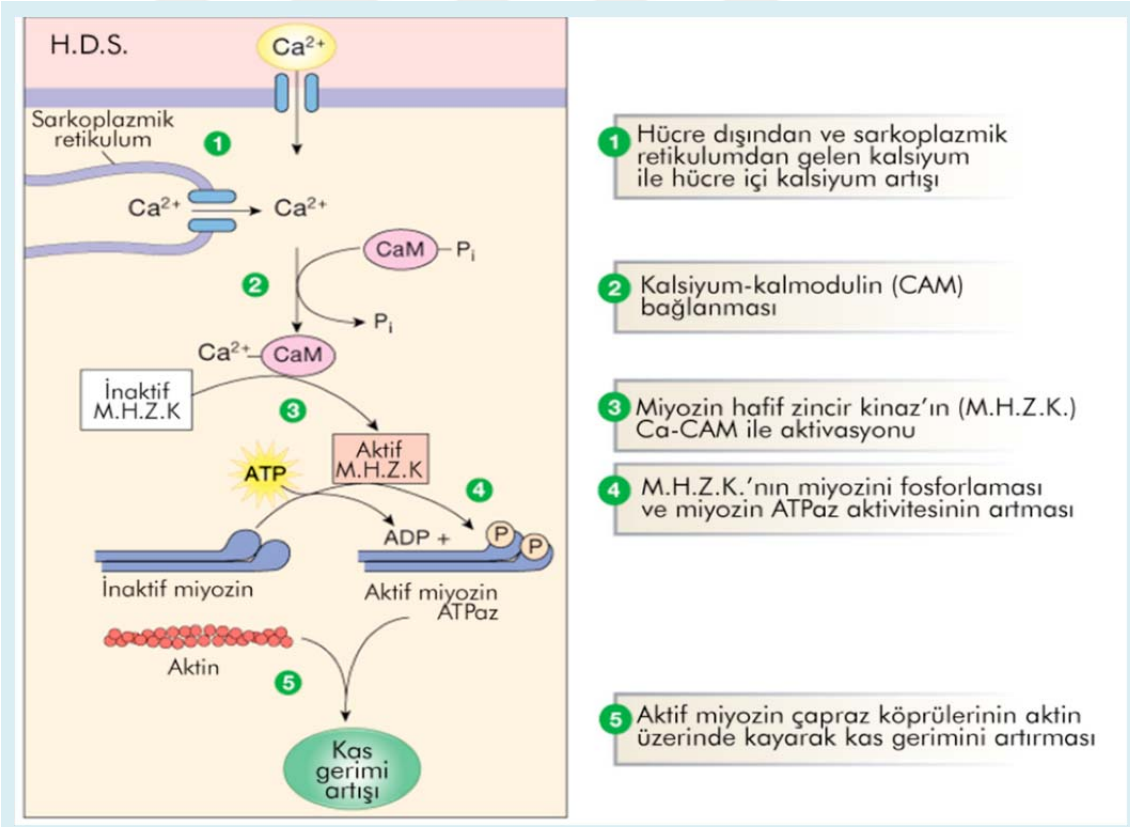
Şekil 2.11. İyonize radyasyon ile hücrede apoptotik süreçlerin tetiklenmesi (58)

2.8. Vasküler Düz Kas Kasılması

Vasküler düz kasın (VSM) kasılmasına neden olan kasılma özellikleri ve mekanizmaları, kalpteki kaslardan çok farklıdır. VSM, yavaş, sürekli ve tonik kasılırken, kardiyak kasları ise hızlı ve kısa (birkaç yüz milisaniye) süreli kasılırlar. VSM, aktin ve miyozini içerir, ancak kalpte olduğu gibi düzenleyici protein troponini içermez. Ayrıca, aktin ve miyozinin VSM'de düzenlenmesi, kalp kasında olduğu gibi ayrı bantlar halinde düzenlenmemektedir. Bu, VSM'nin kasılma proteinlerinin dağınık olduğunu ve iyi gelişmiş olmadığını ima etmek değildir. Çünkü, tonik kasılmaları korumak ve lümen çapını azaltmak için aslında oldukça organizedirler.

VSM'deki kasılma mekanik, elektriksel ve kimyasal uyaranlarla başlatılabilir. VSM'nin pasif gerilmesi, düz kastan kaynaklanan kasılmaya neden olabilir ve bu nedenle miyojenik yanıt olarak adlandırılır. VSM hücre membranının elektriksel depolarizasyonu, büyük olasılıkla, kalsiyumun hücre içi konsantrasyonunda bir artışa neden olan voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını (L-tipi kalsiyum kanalları) açarak kasılmayı ortaya çıkarmaktadır. Son olarak, norepinefrin, anjiyotensin II, vazopressin, endotelin-1 ve tromboksan A2 gibi birtakım kimyasal uyarılar kasılmaya neden olabilir. Bu maddelerden her biri VSM hücresindeki (veya VSM'nin bitişiğindeki endotel

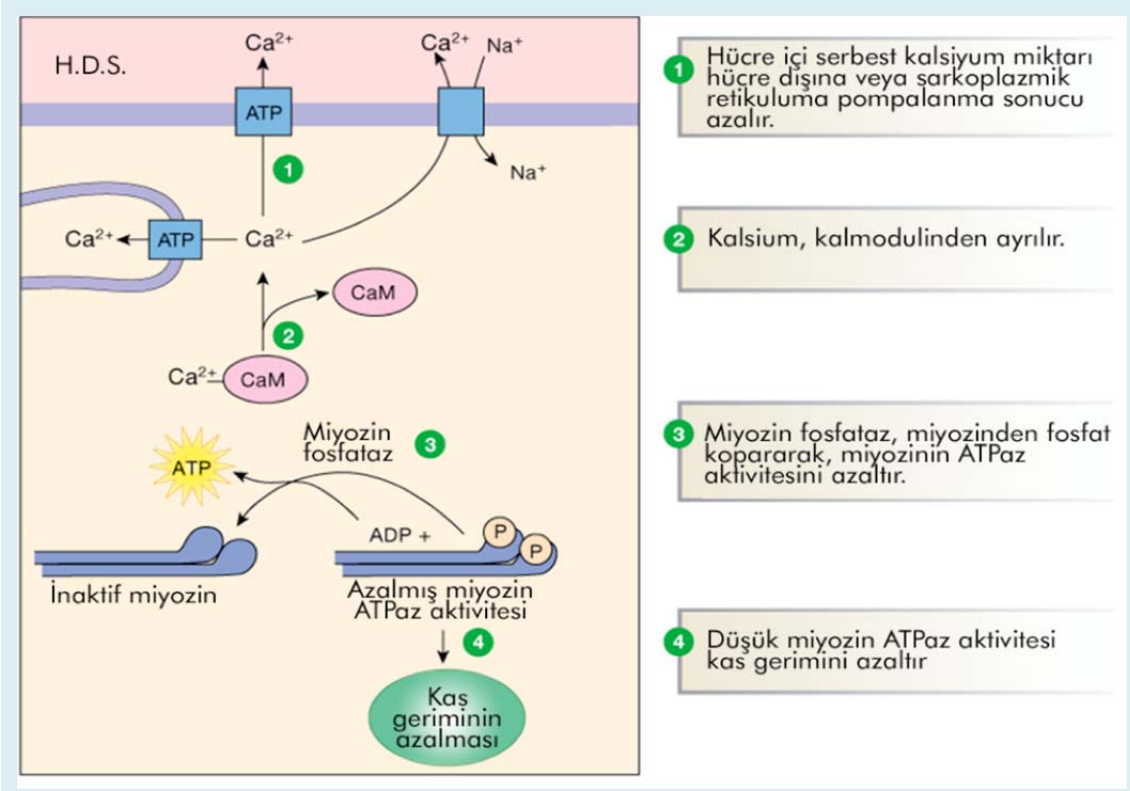
üzerindeki reseptörler) spesifik reseptörlere bağlanır ve VSM kasılmasına neden olur. Kasılmanın mekanizması, hücre içi kalsiyumu arttırmak için bir araya gelen farklı sinyal iletim yollarını içerir. Hücre içi kalsiyumda bir artışın VSM kasılması uyaran mekanizması Şekil 2.12'de gösterilmiştir. Serbest hücre içi kalsiyumda bir artış, kalsiyum kanalları vasıtasıyla artan kalsiyum akışına veya iç depolardan kalsiyum salınmasına (örneğin, sarkoplazmik retikulum; SR) neden olabilir. Serbest kalsiyum, kalmodulin adı verilen özel bir kalsiyum bağlama proteinine bağlanır. Kalsiyum-kalmodulin, Adenozin Trifosfat (ATP) varlığında miyozin hafif zincir kinazı (MHZK) fosforile edebilen bir enzim olan miyozin hafif zincir kinazı (MHZK) aktive eder. Miyozin hafif zincirleri, miyozin başlarında bulunan 20-kD düzenleyici alt birimlerdir. MHZ fosforilasyonu, miyozin başları ve aktin filamentleri arasında çapraz köprü oluşumuna ve dolayısıyla düz kas kasılmasına yol açar (28).



Şekil 2.12. Düz kas kasılma mekanizması (Anonim,2017).

VSM gevşemesi (Şekil 2.13), MHZ'nin azaltılmış fosforilasyonu olduğunda ortaya çıkar. Bu; 1) SR ile kalsiyumun azaltılmış salınması veya hücre içine kalsiyum girişinin azalması, 2) artan hücre içi Siklik adenozin monofosfat (cAMP) konsantrasyonu ile MHZK'nın inhibisyonu ve 3) fosfataz ile aktifleştirilmiş MHZ defosforilasyonundan kaynaklanabilir.

MHZ fosforilasyon derecesi (dolayısıyla VSM kasılma tonusu) G-protein-çift sinyal iletim yolakları, guanil siklaz ve Siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşumunun nitrik oksit aktivasyonu ile düzenlenir. Şekilde gösterildiği gibi, norepinefrin (alfa 1-adrenoseptörler), anjiyotensin II (AT1 reseptörleri), endotelin-1 (ETA reseptörleri) ve vazopresin (V1 reseptörleri) gibi bileşikler tarafından Gq-protein aktivasyonu, kalsiyumun SR salınımını uyarır (IP3 aracılı) ve MHZ fosfatazı (MHZF) inhibe eden Rho kinazı aktive eder. Bu mekanizmaların her ikisi de VSM kasılmasını arttırır. Epinefrin (beta2-adrenoseptörler), adenosin (A2 purinerjik reseptörler) ve prostasiklin (IP reseptörleri) gibi bileşikler tarafından Gs-protein aktivasyonu, MHZK'yi inhibe eden cAMP'yi arttırarak MHZ fosforilasyonunu azaltır ve VSM'yi gevşetir. Norepinprinin alfa2-adrenoseptörlerine bağlanmasıyla Gi-protein aktivasyonu, cAMP'yi azaltarak kasılmayı ortaya çıkarır ve bu da MHZK'nın aktivitesini arttırır.



Şekil 2.13. Düz Kas Gevşeme mekanizması (Anonim, 2017).

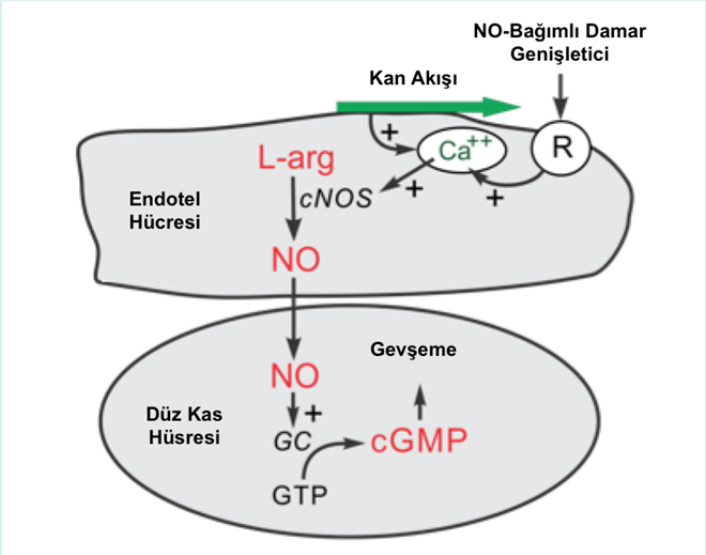
Hücre içi kalsiyum konsantrasyonları düz kas kasılması ve gevşemesinde çok önemlidir. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu, hücrelere giren kalsiyum, hücre içi depolama yerleri (örneğin SR) tarafından salınan kalsiyum ve kalsiyumun ya depolama alanlarına veya hücrenin dışına çıkarılması arasındaki dengeye bağlıdır. Kalsiyum SR tarafından bir ATP'ye bağımlı kalsiyum pompası ile yeniden kenetlenir. Kalsiyum, hücreden ATP'ye bağımlı kalsiyum pompası veya sodyum-kalsiyum pompası ile dış çevreye gider (28).

2.9. Nitrik Oksit Biyosentezi

Nitrik oksit (NO) vücudun birçok hücresi tarafından üretilir, ancak vasküler endotel ile üretimi özellikle kan akışının düzenlenmesinde önemlidir. Vasküler fonksiyonda önemi nedeniyle farklı hastalık hallerinde ortaya çıkan anormal NO üretimi, kan akışını ve diğer vasküler fonksiyonları olumsuz şekilde etkileyebilir.

NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimatik hareketi aracılığıyla amino asit L-arginden üretilir. NOS'un iki endotel formu vardır: yapıcı NOS (cNOS: tip III) ve indüklenebilir NOS (iNOS: tip II).

Kan damarlarındaki NO, normal ve bazal koşullar altında sürekli olarak cNOS tarafından üretilmektedir (Şekil 2.14). cNOS aktivitesi, kalsiyum ve kalmoduline bağımlıdır. cNOS'un uyarılması için iki temel yol vardır, bunların her ikisi de, alt sarkolemma deposundaki kalsiyum iyonlarının salınmasını içerir. İlk olarak, kan akışıyla üretilen vasküler endotele etki eden kuvvetler, kalsiyumun salınmasına ve daha sonra cNOS aktivasyonuna neden olur. Bu nedenle, kan akışındaki artışlar NO oluşumunu uyarır (akışa bağlı NO oluşumu). İkincisi, çeşitli ligandlar için endotel reseptörler, kalsiyum salınımını ve ardından NO üretimini uyarır (reseptör tarafından uyarılan NO oluşumu). Endotelyal NOS'un diğer izoformu iNOS'dur. Aktivasyonunun kalsiyumdan bağımsız olması bakımından cNOS'dan farklıdır. Normal, bazal koşullar altında, iNOS'un aktivitesi çok düşüktür. INOS'un aktivitesi, iltihap sırasında bakteriyel endotoksinler (örneğin lipopolisakkarit) ve sitokinler, örneğin tümör nekroz faktörü (TNF) ve interlökinler tarafından uyarılır.



Şekil 2.14. NO sentezi.

2.10. NO'nun Vasküler sisteme Etkileri

NO'nun vasküler etkileri aşağıdakileri içerir:

- Direkt vazodilatasyon (akışa bağlı ve reseptör aracılı)
- Vazokonstriktör (damar daraltan ilaç) etkilerini inhibe ederek dolaylı vazodilatasyon (örn., Anjiyotensin II ve sempatik vazokonstrüksiyonu inhibe eder)
- Anti-tromboz etkisi - trombositlerin vasküler endotele yapışmasını engeller

- Anti-inflamatuar etki - vasküler endotele lökosit yapışmasını engeller; Süperoksit anyonunu temizler
- Anti-proliferatif etki - Düz kas hiperplazisini engeller (59).

2.11. Hidrojen Peroksit ve Apoptoz

Reaktif oksijen türleri (ROS), hayati hücresel süreçlerde rol oynayan önemli patofizyolojik moleküllerdir. Düşük ROS konsantrasyonları önemli fizyolojik rollere sahiptir. Hücre döngüsü çoğalmasını, büyümesini ve önemli sinyal verme süreçlerini düzenlerler. Yüksek konsantrasyonlarda aşırı derecede zararlıdır çünkü radikallerin oluşumunu ve lipitlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin oksidasyonunu hızlandırırlar ve bu da apoptoz ile sonuçlanabilir.

ROS'un düzensizliği ve redoks homeostazında bozulma karmaşık hastalıkları oluşmasına neden olur. Mitokondriyal disfonksiyona bağlı olarak kanser hücrelerinde ROS düzeylerinin önemli ölçüde arttığı göz önüne alındığında, ROS metabolizması etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için hedeflenmiştir ve antioksidanlar potansiyel kemoterapötik ilaçlar olarak kullanılmaktadır (60).

Reaktif oksijen türlerinin nonradikal bir biçimi olan hidrojen peroksit (H_2O_2), vasküler endotel, düz kas hücreleri, fibroblastlar ve aktive polimorf nükleer lökositler ve makrofajlar tarafından üretilebilir. H_2O_2 kan akışının lokal olarak düzenlenmesine katılabilir, çünkü H_2O_2 vazomotor bir ajandır ve damarların daralmasına veya rahatlamasına neden olur (60-65). Daha önce yapılan çalışmalarda fenilefrin yanıtı üzerine eklenen 1 mM H_2O_2 kasılma yanıtlarının bifazik olduğu gösterilmiştir. H_2O_2'nin farklı dozları uygulandığında (0,3 mM'dan büyük dozlarda) bifazik kasıldığı, düşük dozlarda (10 ve 100 μM) ise gevşeme yanıtı oluşturduğu görülmüştür (66,).

Hidrojen peroksit (H_2O_2), proliferasyonu, farklılaşmayı ve apoptozu kontrol eden kinazların aktivitesini düzenler.

2.12. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi

Canlılarda gerçekleşen birçok önemli olaylarda kalsiyum (Ca^{+2}) iyonları büyük bir role sahiptir. Ca^{+2} hem hücre içi olaylarda hem de hücreler arası etkileşimlerde belirleyici bir iyondur. Hücre içi Ca^{+2} sinyali, hücre içinde Ca^{+2} konsantrasyonunun geçici olarak artışından meydana gelir. Ca^{+2} bu sinyal oluşturma özelliğine sahip olduğu

için hücre de ikincil habercidir. Ca^{+2}'un çeşitli formlara dönüşmesi, Ca^{+2} sinyalinde görev alan elemanların dinamikleri ile ilgilidir. Ca^{+2} sinyalinin bu özelliğe sahip olmasından dolayı çok büyük çeşitlilik barındırmaktadır. Bu çeşitliliğin incelenip anlaşılması, Ca^{+2}'un ikincil haberci olarak değerlendirilmesinde önemli bir faktördür. Bunu gerçekleştirmenin yolu da Ca^{+2} sinyallerini düzenleyen elemanların özelliklerinin anlaşılmasıdır.

Hücre içi Ca^{+2} sinyalinin en önemli özelliklerinden biri geçici olmasıdır. Ca^{+2} konsantrasyonu geçici bir süre artmakta daha sonra azalmaktadır. Elektriksel olarak uyarılmayan hücrelerde hücre dışından hücre içine giren Ca^{+2}'un sinyale katkısı olsa da Ca^{+2} sinyalini başlatan asıl mekanizma IP3R'ler üzerinden oluşan Ca^{+2} salınımıdır. Bu nedenle Ca^{+2} sinyalini belirleyen temel eleman IP3 varlığıdır.

2.13. Hücre İçi Ca^{+2} Sinyalinin Oluşumu

Ca^{+2}'un hücre içi sinyal molekülü görevini üstlenmesinin nedeni, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun hem hücre dışı ortama hem de hücre içinde Ca^{+2} depolayan yapılara göre çok düşük olmasıdır. Hücre dışındaki Ca^{+2} konsantrasyonu yaklaşık olarak 10^{-3} M, Ca^{+2} depolarında örneğin endoplazmik retikulumda $5x10^{-4}$ M iken hücre içindeki Ca^{+2} konsantrasyonu bu değerlerden daha küçük 10^{-7} M seviyelerindedir. Bundan dolayı hem hücre içi ile hücre dışı arasında hem de hücre içi ile depolarda çok büyük derişim farkı vardır bu derişim farkı da büyük bir sürdürücü kuvvet oluşturur. Hücre zarı ve ER zarından Ca^{+2}'un geçişi bu sürdürücü kuvvetlerin etkisi ile protein yapıdaki kanallar sayesinde olur. Bu kanallar genellikle kapalı durumda olup voltaj, mekanik uyarı ya da ligand bağlanması ile aktive olur.

Hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} girişini sağlayan kanallar;

1. Voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları: bu kanallar membran depolarizasyonu sonucu aktive olur ve voltaja bağımlı sodyum ve potasyum kanalları ile ilişkilidir.
2. Ligand bağımlı Ca^{+2} kanalları: bu kanallar hücre dışından gelen ligandların bağlanması ile aktive olur. Bu kanallar aynı zaman da bir reseptördür. (P2X pürinerjik reseptörleri ve nikotinik asetikolin (ACh) reseptörleri)

Depo boşalması ile aktive olan kanallar;

Bu kanalların aktivasyon mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Hücre içi Ca^{+2} depoları Ca^{+2} sinyali sonucu ya da farklı şekiller de boşandığı zaman bu kanallar hücre içine Ca^{+2} geçişine neden olurlar. Bu kanallara örnek olarak transient reseptör potansiyeli (TRP) kanallarının bazıları verilebilir. Bu kanallar hem Ca^{+2} sinyalini hem de Ca^{+2} homeastazını düzenlerler.

Hücre içi Ca^{+2} depolarından Ca^{+2} çıkışını sağlayan yapılar;

1. Ryanodin reseptörleri: sarkoplazmik retikulumdan Ca^{+2} salınımını sağlayan bir reseptördür. Bu reseptörlerin aktivasyonu voltaja bağlı Ca^{+2} kanallarından hücre içine giren Ca^{+2} ile olmaktadır. Bu reseptörler Ca^{+2} ile zaman içerisinde önce aktive sonra inhibe olmaktadır ve aktif iken Ca^{+2} kanalı özelliği göstermektedir.
2. İnositol 1-4-5-trifosfat reseptörleri (IP3R): bu reseptörler, hücre içi sinyal iletiminde en yaygın ikincil habercilerden biri olan 1,4,5-trifosfat (IP3) etkisi ile aktive olmaktadır ve ER'den Ca^{+2} salınımına neden olur. IP3R, ATP, fosforilasyon, kalmodülin gibi proteinler ile etkileşir ve bu proteinlerin reseptör fonksiyonunu düzenler.

Ca^{+2} sinyalinin geçici olması özelliğini IP3 varlığında da sürdürmektedir bu özelliği sağlayan iki mekanizma vardır;

Bu mekanizmalardan birincisi; IP3 aktivasyonunun ortamda IP3 olması durumunda bile geçici olmasıdır. IP3R'leri etrafında Ca^{+2} konsantrasyonu arttığı zaman inhibe olmaktadır. Başka bir düşünce ise reseptörlerin IP3'e karşı adaptasyon özelliği göstermesidir.

İkinci mekanizma; enerji kullanılarak, pompa ve değiş tokuş aracılığı ile sitoplazmada artan Ca^{+2} konsantrasyonunun azaltılmasıdır. Bu pompa değiş tokuşculardan Ca^{+2}'u tekrar hücre içi Ca^{+2} depolarına pompalayan ATPaz Ca^{+2} SR/ER ATPaz (SERCA) ve hücre dışına pompalayan ise plazma membranı Ca^{+2} ATPaz (PMCA)'dır. Ca^{+2}'un hücre dışına atılmasında sodyum-kalsiyum pompası da görev alır. Tüm bu süreçlerde enerji kullanılmaktadır ve bunun nedeni Ca^{+2}'un konsantrasyon gradientinin tersine hareketinin sağlanmasıdır.

Ca^{+2} sinyaline ait diğer bir özellik ise sinyalin çoğunlukla osilasyonlar şeklinde olmasıdır. Bu osilasyonun tepe noktaları ve frekansları uyarı şiddeti ve cinsine göre değişmekte olup hücrelerde farklı sonuçlara neden olmaktadır. Yapılan çalışmalara göre osilasyon görülmesinde uyarı şiddeti ve SERCA aktivesinin belirleyici olduğu gösterilmiştir. SERCA'nın yüksek ekspresyonunda osilasyon sıklığını etkilediği görülmüştür (68-71).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Sıçanların Temin Edilmesi

Çukurova Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi (DETAUM)'dan alınan ağırlıkları 200-250 g arasında değişen Albino Wistar türü 24 adet sıçan, 22-24 $°C$ sıcaklık ve %40-60 olan rölatif nemi olan Biyofizik Anabilim Dalı laboratuvarında her kafeste 5-6 tane sıçan olacak biçimde yerleştirildi. Deney hayvanları deney süresi boyunca ad-libutum olarak beslendi. Laboratuvar, 12 saat gece 12 saat gündüz olacak şekilde ışıklandırıldı. Ayrıca klima ve aspirator sistemi ile havalandırılma işlemi yapıldı.

3.2. Deney Grupları

Deney hayvanları laboratuvar ortam ve şartlarına alışmaları için 1 hafta kafeslerde tutuldu ve her grupta 20 adet olacak şekilde iki gruba ayrıldı. Bir gruba PMA uygulaması yapıldı, diğer grup ise kontrol olacak şekilde manyetik alan bölgesine yerleştirildi ancak manyetik alan şiddetine maruz kalmadı. Deney grubu için ayrılan hayvanlar günde bir defa ve her gün aynı saatte, 1 saat boyunca PMA'ya (1,5 mT ve 40 Hz) maruz bırakıldı. PMA uygulama süresi, literatürde PMA'nın etkisinin görüldüğü çalışmalar incelenip optimize edilerek belirlendi (72-75).

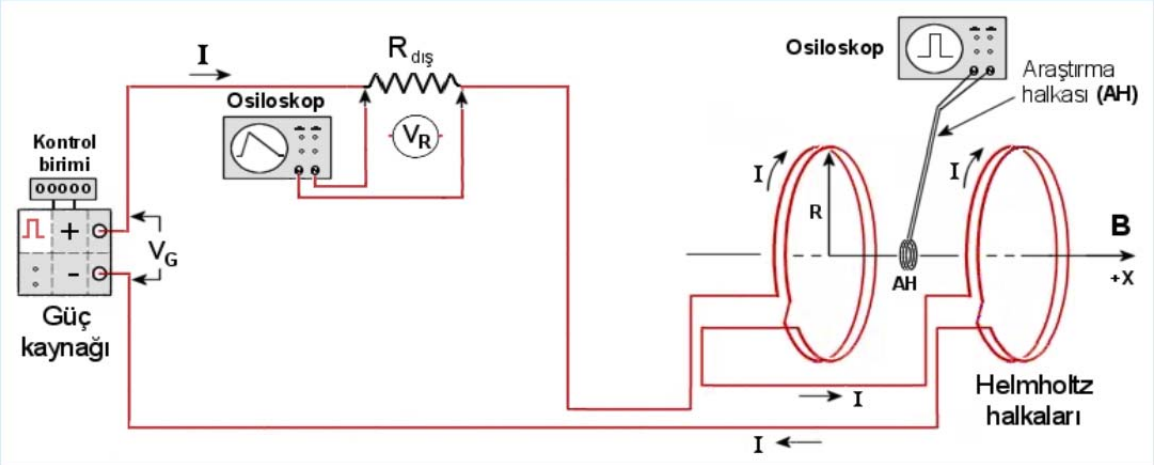
Hayvanlar deney grubuna bağlı olarak 30 gün PMA uygulamasının veya kontrol 30 günün ardından pentalsodyum verilerek bayıltıldıktan sonra torasik aortaları çıkartıldı.

3.3. Sıçanların Bakımı

Deney süresince sıçanların bakıldığı kafesler haftada 3 kez temizlendi. Klimalı ve oda ışığı kontrollü ortamda su ve yiyecek erişimleri sağlanır şekilde hayvanların bakımı yapıldı. Hayvanlar her gün gözetim altında tutularak sağlık durumları, saldırganlık davranışı gösterip göstermedikleri kontrol edildi. Herhangi bir saldırganlık durumu veya hastalık olması durumunda hayvanlar ayrı kafeslere alınarak grup dışı bırakıldı.

3.4. Pulslu Manyetik Alan Sistemi

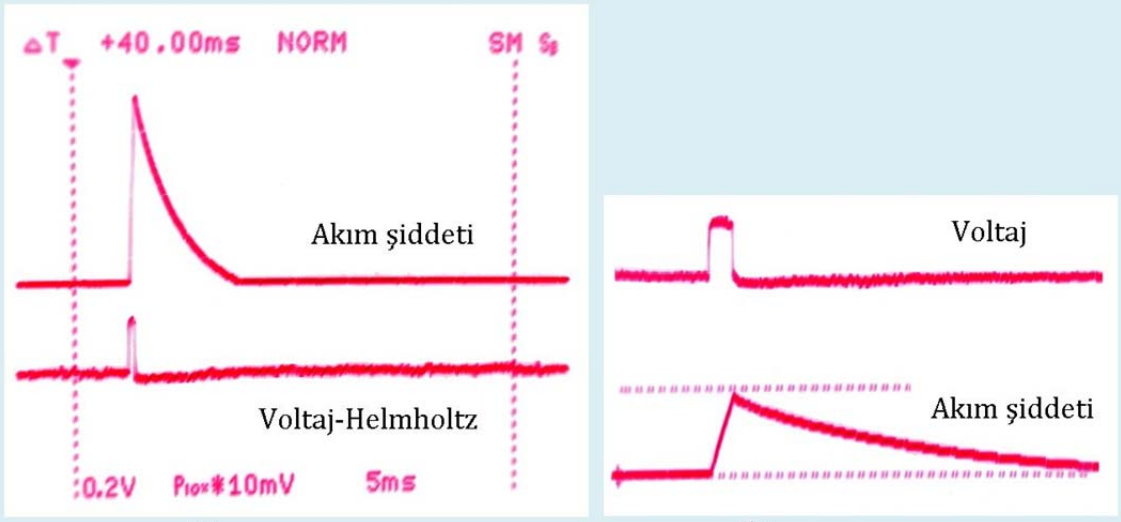
Pulslu manyetik alan sistemi güç kaynağı ve düzgün manyetik alan üreten aralarında 30 cm uzaklık bulunan bir çift Helmholtz bobininden (60 cm çaplı) oluşmaktadır. Bir sinyal üretecine (ILFA Elektronik, Adana, Türkiye) bağlandığında, bu bobinler, 1,5 mT'lik bir manyetik alan üretir. Manyetik alanın tepe değeri, Hall efekt problu bir Gauss Metre (FW Bell model 6010, Sypris, FL) ile ölçüldü. Solenoid veya Helmholtz bobinleri arasında oluşturulan manyetik alanın büyüklüğü ve şekli bir Gauss/Tesla metre veya "araştırma halkası=search coil" kullanılarak ölçülebilir ve gözlenebilir (Şekil 3.1). Helmholtz bobinleri arasındaki, indüktif elektrik alanın büyüklüğü ve dalga formu, çapı 50 mm olan bir araştırma halkası ile gözlendi. İndüktif gerilim bobinde akım üretir ve bu akımlar güç amplifikatörünün çıkışı ile bobinin çıkışı arasında seri bağlanmış bir direnç (0,9 Ohm) vasıtasıyla bir osiloskop üzerinde izlendi (76,).



Şekil 3.1. Üzerinden I akımı geçerken Helmholtz halkaları arasında oluşan manyetik alan Tesla metre veya standart araştırma halkası ile ölçülebilir ve biçimi gözlenebilir. Helmholtz halkalarından geçen I akımının büyüklüğü ve biçimi ise, halkalara seri bağlı *R* direnci aracılığı ile ölçülür ve gözlenir.

Helmholtz halkaları arasında oluşan manyetik alanı, devreden geçen *I* akımını ve araştırma halkası ile elde edilen manyetik alanı ölçmek ve şeklini gözlemek için Şekil 3.1'de şematik olarak gösterilen devre kuruldu.

Devreden geçen I akımının şekli ve araştırma halkası ile gözlenen voltaj pulsunun şekli Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 (a) *Üstte*, devreden geçen I akımının şekli ve *altta*, araştırma halkası ile gözlenen voltaj pulsunun şekli. Akım pulsunun yükselme süresi 0,5 ms ve düşme süresi 9,5 ms dir. Bu nedenle alttaki şekilde (dikdörtgen pulsta) küçük bir negatif sapma olarak görülmektedir. (**b**) Aynı akım ve voltajların farklı amplifikasyonlarda gösterilmesi.

3.5. Deney Hayvanlarına Pulslu Manyetik Alan Uygulanması

PMA sistemi Faraday kafesine yerleştirilmiştir. Güç kaynağı (Şekil 3.3a) üzerinde bulunan ekranda (Şekil 3.3b) uygulanacak pulslu manyetik alanın özelliklerini değiştiren bileşenler bulunmaktadır. Buradaki değerler değiştirilerek istenilen Pulslu manyetik alanın frekansı, süresi ve şiddeti (Şekil 3.4) elde edilir.



Şekil 3.3.(a) Güç kaynağı (**b**) Güç kaynağı üzerinde bulunan ekran.

Güç kaynağı üzerindeki değerler bu deney için şu şekildedir;

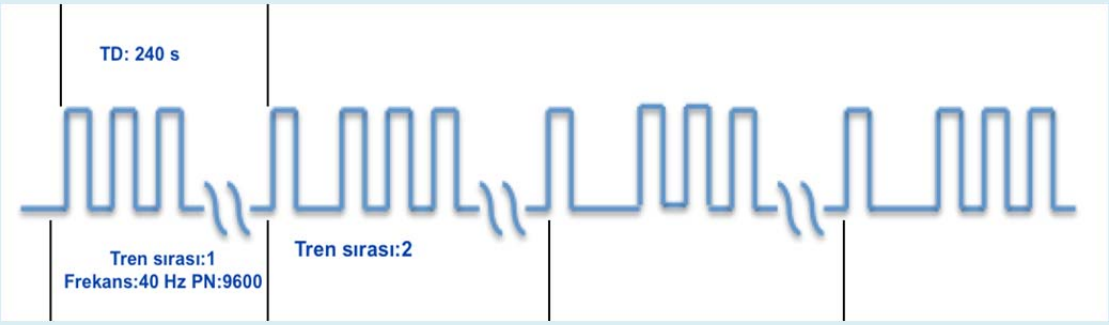
Tekrar: 3 kez

PMA: 1,5 mT

Level (LV) :%32

Tren Numarası (TN): 1,2,3,4.

Puls Numarası (PN): 9600 $\frac{9600}{40}$= 240 s =4 dk



Şekil 3.4. Pulslu manyetik alanın biçim ve süreleri.

PMA grubunda bulunan hayvanlar her gün aynı saatte 1 saat boyunca (1,5 mT ve 40 Hz) 30 gün manyetik alana maruz bırakıldı. Bu işlem sırasında sıçanlar 3 mm kalınlığında şeffaf pleksiglastantan yapılmış özel kafeslere Şekil 3.5'de gösterildiği gibi yerleştirildi.



Şekil 3.5. Pulslu manyetik alana bırakılan deney hayvanları.

3.6. Vasküler Aktivitenin İncelenmesi

Vasküler aktivitenin incelenmesi için organ banyosu sistemi (Şekil 3.6) kullanıldı.

Sıçanlar pentalsodyum (50 mg/kg) ile anestezi edildikten sonra torasik aortanın diyafram üzerinden kalp çıkışına kadar olan kısmı alınarak Krebs-Hanseleit çözeltisi (mM olarak: NaCl 112, KCl 5, $NaHCO_3$ 25, NaH_2PO_4 1, $MgCl_2$ 0,5, $CaCl_2$ 2,5, glukoz 11,5) içerisine bırakıldı. Krebs çözeltisi içerisine alınan damar bağ dokusu temizlenerek deneye hazır hale getirildi. Damar 3 mm kalınlığında halkalar halinde kesildi. Damar dokularının endotel tabakası sıyrıldı. İki tane endotelli, iki tane endotelsiz olmak üzere dört adet şerit formundaki dokular 10 ml banyo hacmi olan organ banyosuna özel kıskaçlar yardımıyla düzeneğe dikey olarak (Şekil 3.7) yerleştirilerek izometrik-gerim ölçer çevirece bağlandı. Gerim, yükseltici aracılığıyla (May Com) bir analog/dijital çevirici ile online bilgisayara kaydedildi. Kasılma yanıtlarından önce damarlar pasif kuvvetlerinin etkisiyle kararlı bir gerime ulaşmaları için 50 dakika spontan aktivite göstermeleri sağlandı.



Şekil 3.6. Organ banyosu sistemi.



Şekil 3.7. Organ banyosuna dikey olarak asılan şerit formundaki torasik aorta dokusu.

Deney protokolü; damar şeritleri asılmadan 30 dakika önce Krebs-Hanseleit çözeltisi 37 °C sıcaklıkta %95 O_2 ve %5 CO_2 karışımıyla gazlandı. Daha sonra şeritler

halindeki damar dokuları organ banyosu sistemine yerleştirildi ve 1 g gerim değerine ulaştıktan sonra 50 dakika kendi haline bırakıldı ve stabil bir gerime ulaşması için beklendi. İlk olarak 60 mM KCl uygulanıp tek doz kasılma yanıtı elde edilerek damarların canlı olup olmadıkları test edildi. Canlılık yanıtları alınan şeritler her 15 dakikada bir banyo hacmi değiştirilerek KCl'nin banyodan uzaklaştırılması için üç kez krebs çözeltisi ile yıkandı.

1. Deney; 1 mM konsantrasyonunda Hidrojen Peroksit (H_2O_2) eklenerek dokular 40 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda dokulara 120 mM konsantrasyonunda KCl uygulanarak kasılma yanıtı kaydedildi.

2. deney; dokulara1 mM konsantrasyonunda Hidrojen Peroksit (H_2O_2)eklenerek 40 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda dokulara 10^{-5} M konsantrasyonunda tek doz α1 -adrenerjik reseptör agonisti fenilefrin uygulanarak kasılma yanıtları elde edildi.

3. Deney; kümülatif KCl dozları (10 mM, 20 mM,40 mM,60 mM) ile kasılma yanıtları kaydedildi.

4. Deney; kümülatif fenilefrin dozları (10^{-9} mM, 10^{-8} mM, 10^{-7} mM, 10^{-6} mM, 10^{-5} mM) uygulandı ve kasılma yanıtları kaydedildi.

5. deney; 1 mM H_2O_2 uygunarak kasılma yanıtları kaydedildi.

6. Deney; dokulara 120 mM konsantrasyonunda KCl dozu eklenerek maksimum kasılma yanıtına ulaşmasından sonra üzerine 1 mM H_2O_2 uygulandı.

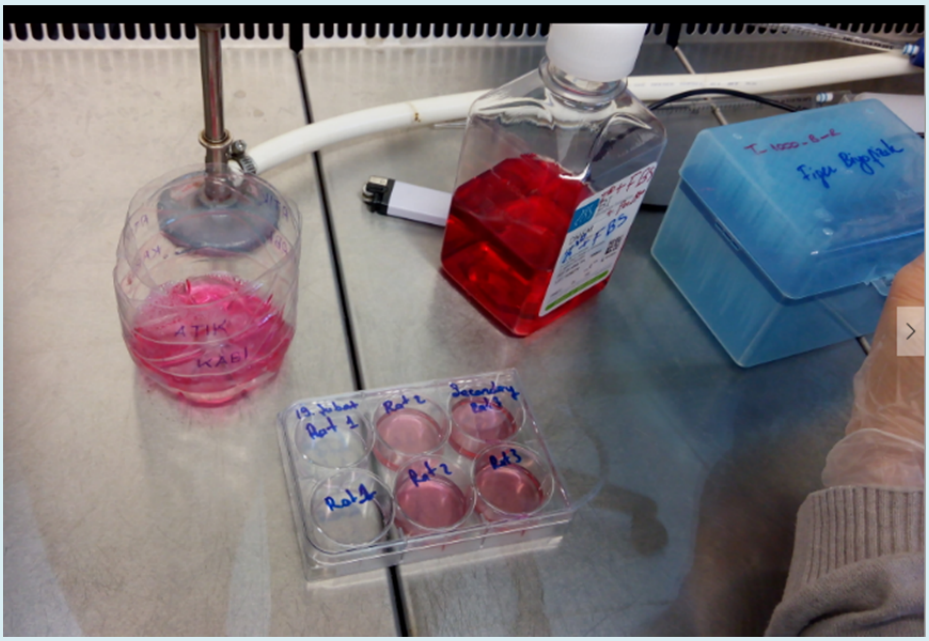
7. Deney; dokulara 10^{-5} mM konsatrasyonunda fenilefrin dozu uygulanıp maksimum kasılma yanıtına ulaşmasından sonra üzerine 1 mM H_2O_2 eklendi.

3.7. Kültür Hücrelerinin Büyütülmesi

Deneye hazır olan ratlardan, vaskuler (torasik aort) düz kas zarar vermeden çıkartılır ve PBS solüsyonunun içine alınarak damar, bağ dokularından arındırılır. PBS (Hücre içi ve dışındaki ozmotik basıncı dengede tutan bir tuz solusyonudur. İçeriğindeki inorganik tuzlar ve su, hücre metabolizmasını destekler. pH'ı tamponlayarak hücreler için uygun bir ortam sağlar).

3.7.1. Primer Hücre Kültürünün Hazırlanması

Ratlardan torasik aortanın alınarak PBS solüsyonu içerisinde bağ dokularından temizlendi. Laminer Kabin içerisinde aorta 6'lık plate içerisine alınarak üzerine1 mg/ ml kollejenaz içeren DMEM eklendi ve 15 dakika İnkübatör de bekletildi. 15 dakikanın sonunda inkübatörden alınarak laminer kabin içerisinde aortanın beyaz dış tabakası temizlendi. Aorta düz bir şekilde ikiye açılarak, endotel tabaka sıyırılırıp ve sterile olan başka bir kuyuya alındı. Üzerine serumlu DMEM eklendi ve son olarak elastaz ve kollejenaz içeren DMEM ilave edildi. Aorta küçük parçalara ayrılıp, inkübatöre alınarak 40 dakika bekletildi. 40 dakikanın sonunda inkübatörden alınarak bir pipet yardımı ile karıştırma işlemi yapıldı. Ardından tekrar inkübatörde 40 dakika bekletildi. İkinci bir 40 dakikanın sonunda hücreler plate den 15 ml lik konik tüpe alınarak (3000 rpm/4 ºC/10 dakika) santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda dibe çöken hücreler alınarak 6 lık platelerde cam lamel üzerine ekililip inkübatörde 6 gün beklemeye bırakıldı (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Plate'lere alınmış hücre kültürü.

3.8. Hücre Kültürlerinin Fura 2-am floresans boya ile yüklenmesi

1.5 mM Kalsiyum-Hepes solüsyonu hazırlandı. Primer hücre kültürleri, her 1 ml kalsiyum-hepes solüsyonu için 5.5 µl fura-2am floresans boya eklenerek oda

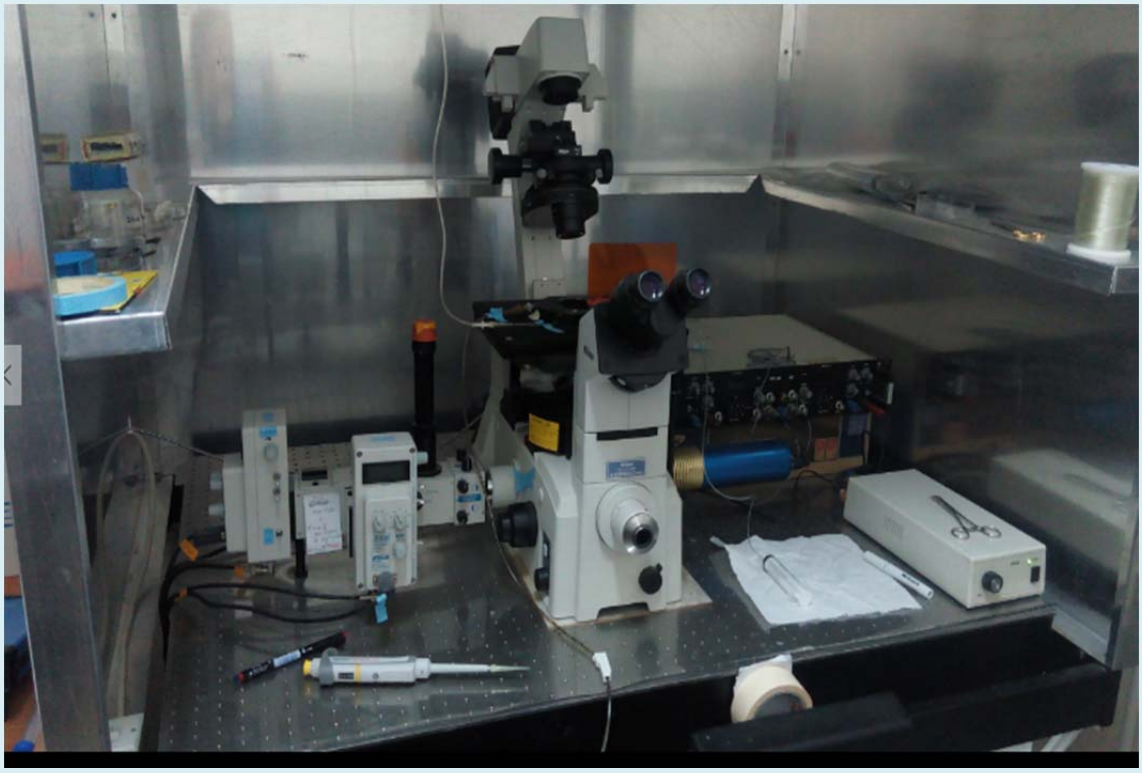
sıcaklığında 50 dakika bekletilmek suretiyle yüklendi. İnkübasyonun ardından geri plan (background) floresansını en aza indirebilmek için hücreler yine aynı solüsyon ile iki defa yıkanıp, boyanın tam metabolize olmasını sağlamak amacıyla 10 dakika daha oda sıcaklığında inkübe edildi.

3.9. Ca^{+2} Sinyalinin Floresans Mikroskopu ile görüntülenmesi

Yüklenmesi tamamlanan hücrelerin deney platformuna yerleştirilmesi ardından üzerlerine 1 ml kalsiyumlu-hepes banyo solüsyonu eklendi. Preparat mikroskopa yerleştirilip ışık kaynağı açıldı. Gözlem yapmaya en küçük büyütmeli objektifle başlanıldı. Deneyler sırasında hücrelere çeşitli kimyasal maddelerin uygulamaları (H_2O_2), bu maddelerin banyo ortamına mikropipet kullanılarak doğrudan eklendi. Bu yolla yapılan uygulama ile 2 solüsyonun birbirine karışma süreleri 1-2 saniye dolayındadır. Gözlem yapılacak hücrelere yapılan uygulamalar ile değişen [Ca^{2+}] i, floresans yoğunluğundaki değişim olarak detektör tarafından deney boyunca bilgisayara gönderilip kaydedildi. Floresans mikroskopu Şekil 3.9'da ve Floresans mikroskopunda alınan bir Ca^{+2} sinyali görüntü gösterilmektedir.

3.10. Kullanılan Kimyasallar

Sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), magnezyum sülfat ($MgSO_4$), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), sodyum hidrojen karbonat ($NaHCO_3$), glukoz, kalsiyum klorür ($CaCl_2$), fenilefrin ve Hidrojen Peroksit (H_2O_2). Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM), Fetal Bovine Serum, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS),Tripsin, Kalsiyumlu Hepes Solüsyonu ve Fura -2am floresans boya.

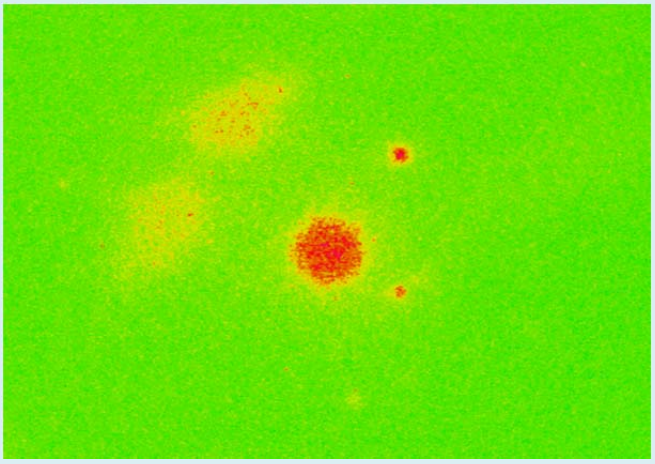


Şekil 3.9. Floresans mikroskopu.

3.11. Sonuçların Değerlendirilmesi

Organ banyosu deneylerinde dokuların kasılma yanıtları KCl veya fenilefrin kasılmalarının %'si olarak ifade edildi ve standart hataları ile birlikte (± SEM) verildi. Farklı konsantrasyonlarda agonist uygulamasına karşı elde edilen yanıtlar GraphPad Prism4 kullanılarak her grubun birbiriyle karşılaştırılmasında student t- testi kullanılarak sonuca gidildi.

Hücre içi Ca^{+2} sinyalinin ölçülmesi deneyi sonunda veri analizi için Image Master, PTI programı kullanıldı. Başlangıçtaki fluoresans kullanılarak, her hücrenin sınırı (Region of Interest, ROI) belirlendi. Deney boyunca sistem tarafından kaydedilen görüntülerde (Şekil 3.10) belirlenen ROI'ler içindeki piksellerin ortalama floresan şiddet değerleri ve bu değerlerin zamanla nasıl değiştiği gözlendi. Geri plandan gelen floresan şiddetinin ölçüme katkısını minimize etmek için hücreler arasındaki boş bölgelerden de ROI'ler alındı. Hücrelerden alınan floresan şiddetlerinden bu değerler çıkartıldı. Daha sonra hücrelerdeki boya yüklenme farklılıklarını ortadan kaldırmak için zaman boyunca alınan floresan şiddetleri aynı ROI'den deney başında ölçülen değerlere bölündü (F/F0).



Şekil 3.10. Floresans mikroskopunda alınan bir Ca^{+2} sinyali görüntüsü.

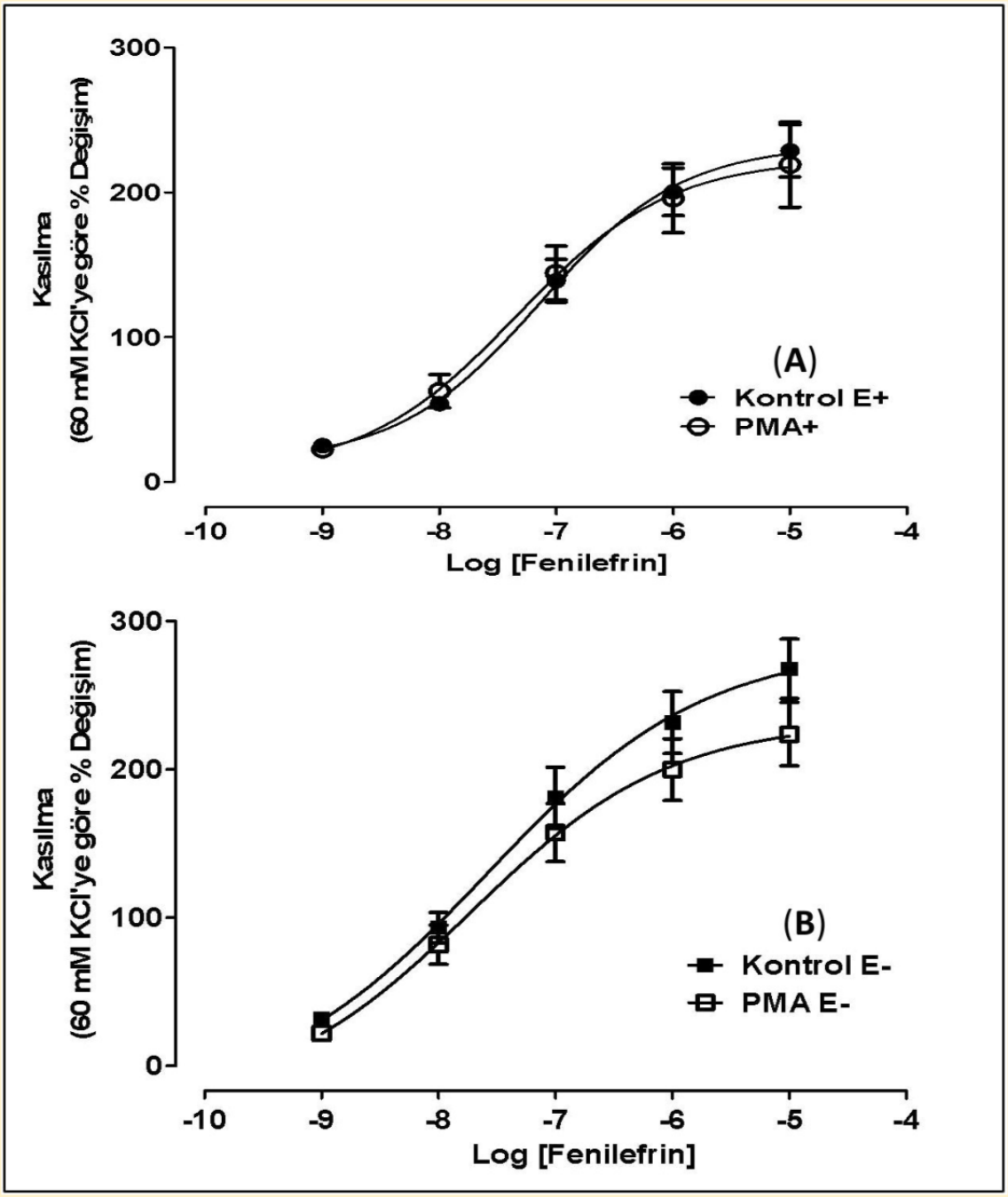
4. BULGULAR

4.1. PMA'nın Kasılma Yanıtlarına Etkisi

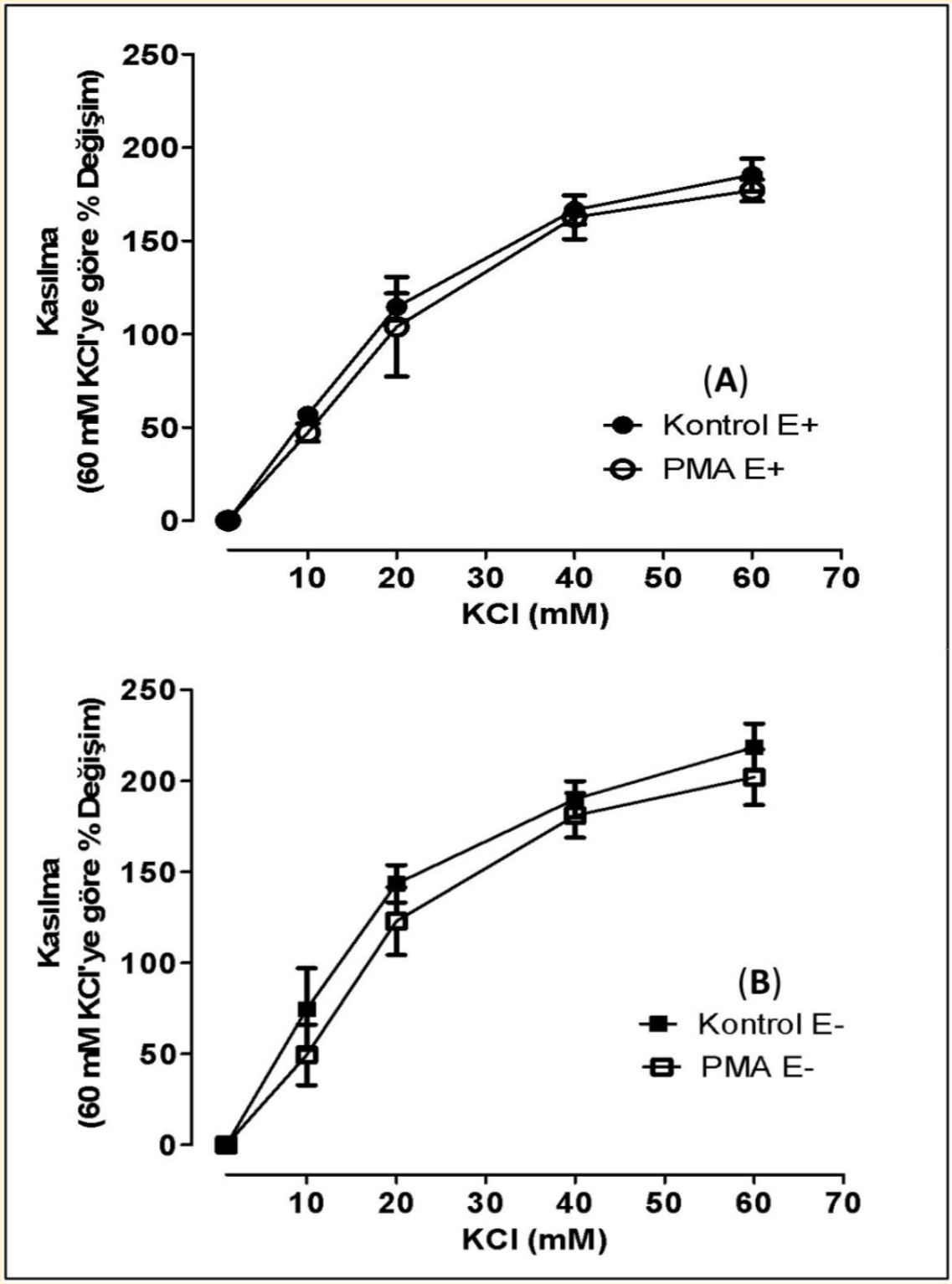
PMA'nın vasküler düz kas kasılmasına etkisini incelemek için halkalar halinde ayrılan damar örnekleri, izometrik kuvvet çevirecine bağlandı. Ardından dokulara a1-adrenerjik reseptör agonisti Fenilefrin (Şekil 4.1 A-B) ve KCl (Şekil 4.2.A-B) kümülatif olarak eklendi. Fenilefrin için bu dozlar: 10^{-9}- 10^{-5} M ve KCl için 1 ile 60 mM aralığındadır. Endotelli dokularda PMA'nın Fenilefrin kasılma yanıtlarını etkilemediği gözlendi (Şekil 4.1.A).

Sonuçlar nonlineer regresyon analizi ile incelendi. Yanıtların EC_{50} (log) değerleri kontrol ve PMA grupları için sırasıyla -7,141 ±0,202 ile -7,337 ±0,361 olarak bulundu. Şekil 4.1.B'de endotelsiz dokuların EC_{50} (log) değerleri ise kontrol ve PMA grupları için -7,586 ±0,530 ve -7,725 ± 0,610 olarak bulundu. Endoteli sıyrılmış dokular maksimum kuvvet yüzdesi olarak karşılaştırıldığında kontrol grubunun yanıtları (%284,0 ± 40,8), PMA grubunun yanıtlarından (232,8 ± 32,09) büyük olmakla birlikte bu yanıtlar da istatiksel olarak farklı çıkmadı (Şekil 4.1.B).

PMA'nın vasküler kas kasılmasına etkileri KCl uygulaması ile de incelendi. Endotelli dokuların kasılma değerleri Şekil 4.2.A'da ve endotelleri sıyrılmış dokuların kasılma değerleri Şekil 4.2.B'de gösterildi. KCl yanıtlarında da PMA uygulamasının yanıtların büyüklükleri üzerine dramatik bir etkisi olmadı. Maksimum yanıt değerleri incelendiğinde Endotelli kontrol ve PMA grupları için sırasıyla 182 ±8,74 ve 176,9 ±5,88 olarak bulundu. Endoteli sıyrılmış kontrol ve PMA grubu için ise değerler sırasıyla 218,5 ±12,95 ve 202,0 ±15,25 oldu.



Şekil 4.1. Endotelli ve Endotelsiz damar dokularında Fenilefrin dozlarına alınan kasılma yanıtları. (**A**) Kontrol ve PMA uygulaması yapılmış endotelli dokuda Fenilefrine kasılma yanıtları. (**B**) Endoteli sıyrılmış dokuda Fenilefrin kasılma yanıtları. Deneysel ortalamaların 4 - 5 hayvandan n: 8 olarak yapılmıştır.

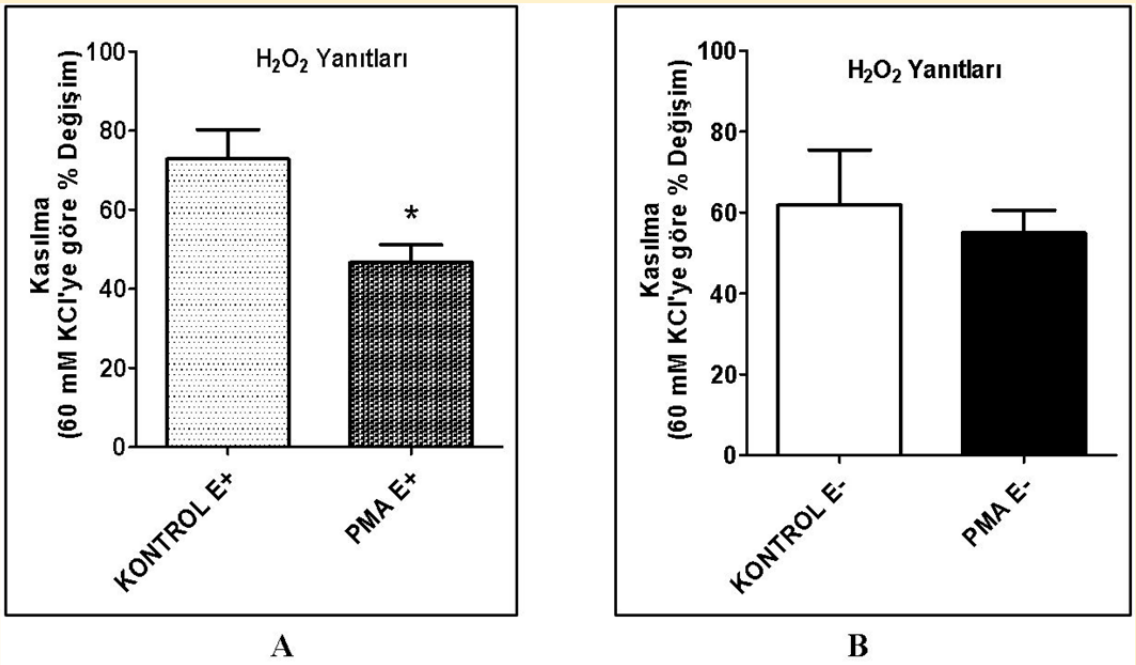


Şekil 4.2. Endotelli ve Endotelsiz damar dokularında KCl dozlarına alınan kasılma yanıtları. (**A**) Kontrol ve PMA uygulaması yapılmış endotelli dokuda KCl kasılma yanıtları. (**B**). Endoteli sıyrılmış dokuda KCl kasılma yanıtları. Deneysel ortalamaların 4 - 5 hayvandan n: 8 olarak yapılmıştır.

4.2. PMA'nın Vasküler Düz Kas Kasılma Yanıtlarına Etkisinin H_2O_2'nin Akut Etkinliği Üzerinden İncelenmesi

4.2.1 H_2O_2'nin Tek Başına Uygulanması

Çalışmada H_2O_2'nin kasılma yanıtlarına akut etkisi incelendi. Bunun için Kontrol ve PMA uygulanmış dokuların üzerine H_2O_2 eklendi ve kasılma yanıtları ölçüldü. Endotelli dokularda H_2O_2'nin PMA uygulaması yapılmış grubun kasılmalarını kontrole göre önemli ölçüde azalttığı gözlendi (Şekil 4.3.A). Aynı deney protokolü endoteli sıyrılmış dokular için tekrarlandığında PMA grubunun ortalama kasılma değerinde bir miktar azalma gözlense de bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.3 B).



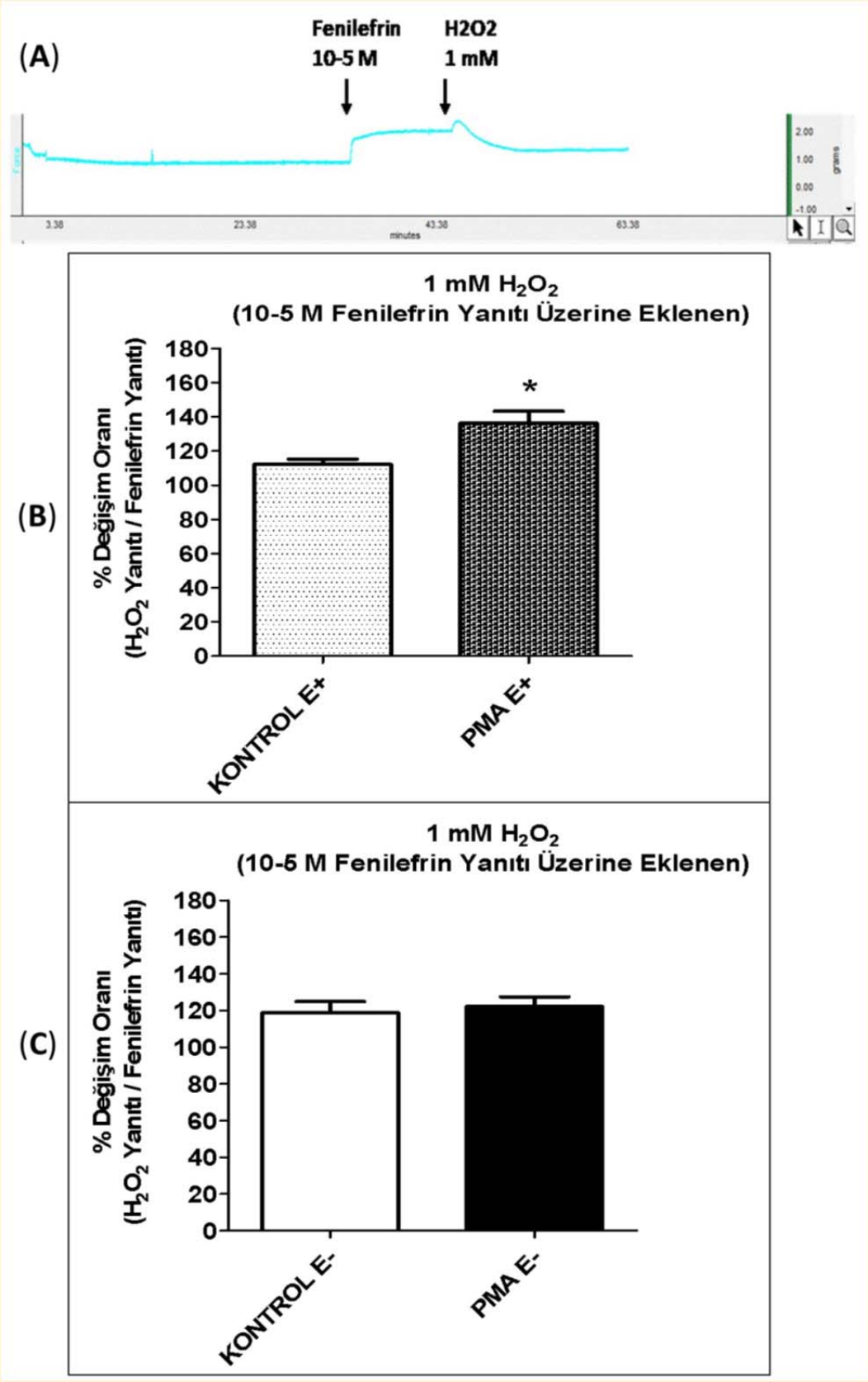
Şekil 4.3. Endotelli ve Endotelsiz damar dokularında H_2O_2 uygulaması ile oluşan kasılma yanıtlarının karşılaştırılması. (**A**) Endoteli sağlam damar dokusunda elde edilen kasılma yanıtları kontrol ve PMA grupları arasında karşılaştırılmıştır. * $p<0,05$ kontrol grubu. İstatistiksel karşılaştırma student t-testi ile yapılmıştır. Analiz, ortalama ±SEM olarak gösterilmiştir. (**B**). Endoteli sıyrılmış kontrol ve PMA gruplarında H_2O_2'ye kasılma yanıtları.

4.2.2 H_2O_2'nin Fenilefrin ile Birlikte Uygulanması

Dokuya fenilefrin maximum doz (10^{-5} M) uygulaması yapılmasının ardından kasılma yanıtı platoya ulaştığında (yaklaşık 10 dakika içinde) deney solüsyonu yıkanmadan küvete H_2O_2 eklendi. Şekil 4.4.A'da uygulama anları ok ile belirtilmiştir. Şekildeki örnekte de görüldüğü gibi Fenilefrin etkinliği devam ederken H_2O_2 uygulaması bifazik bir yanıta neden oldu: Önce bir süre kasılma miktarı arttırmış ancak daha sonra azalarak yeni bir plato fazına ulaşmıştır.

Fenilefrin ile kastırılmış endotelli dokuda kontrol ve PMA gruplarının H_2O_2 ye verdikleri kasılma yanıtları Şekil 4.4B'de gösterildi. Kasılma yanıtlarının PMA grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlam ($p<0,05$) şekilde arttığı görüldü. İstatistiksel karşılaştırma student t-testi ile yapıldı. Büyüklükler, ortalama ±SEM olarak verildi.

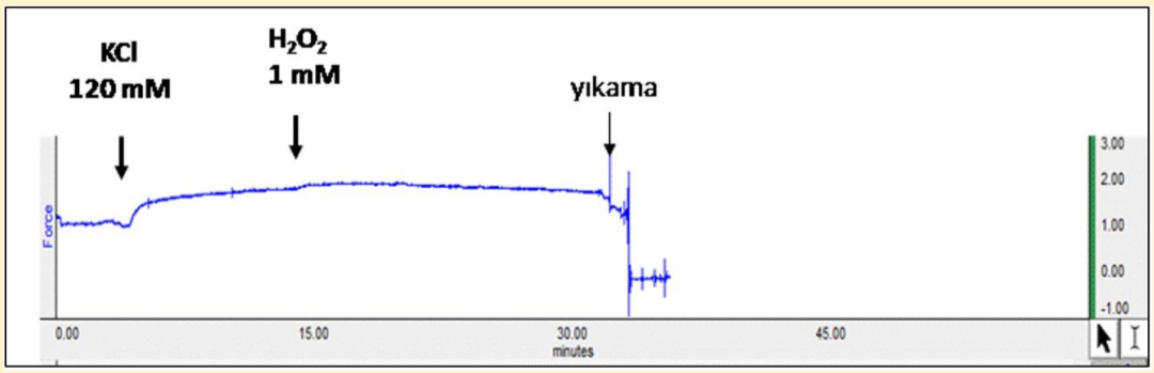
Fenilefrin ile kastırılmış endoteli sıyrılmış kontrol ve PMA gruplarında H_2O_2'ye verilen kasılma yanıtları Şekil 4.4B de gösterildi. Kontrol ve PMA gruplarının ortalama kasılma değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).



Şekil 4.4. (A) Fenilefrin 10^{-5} M uygulamasının ardından, yıkama yapılmadan H_2O_2 deney küvetinin içine ok ile belirtilen zamanda eklendi. (**B)** Endotelli dokuda PMA grubu * p<0,05 kontrol grubu. İstatistiksel karşılaştırma student t-testi ile yapıldı. Analiz, ortalama ±SEM olarak gösterildi. (**C**) Endoteli sıyrılmış kontrol ve PMA gruplarında H_2O_2'ye kasılma yanıtları.

4.2.3 H_2O_2'nin KCl ile Birlikte Uygulanması

Fenilefrin uyarısı ile yapılan deney protokolü KCl ile tekrarlandı. Ancak KCl üzerine eklenen H_2O_2 kasılmaya pozitif veya negatif bir katkı sağlamadı. Yapılan deneyi temsilen kaydedilen bir veri Şekil 4.5'te gösterildi.

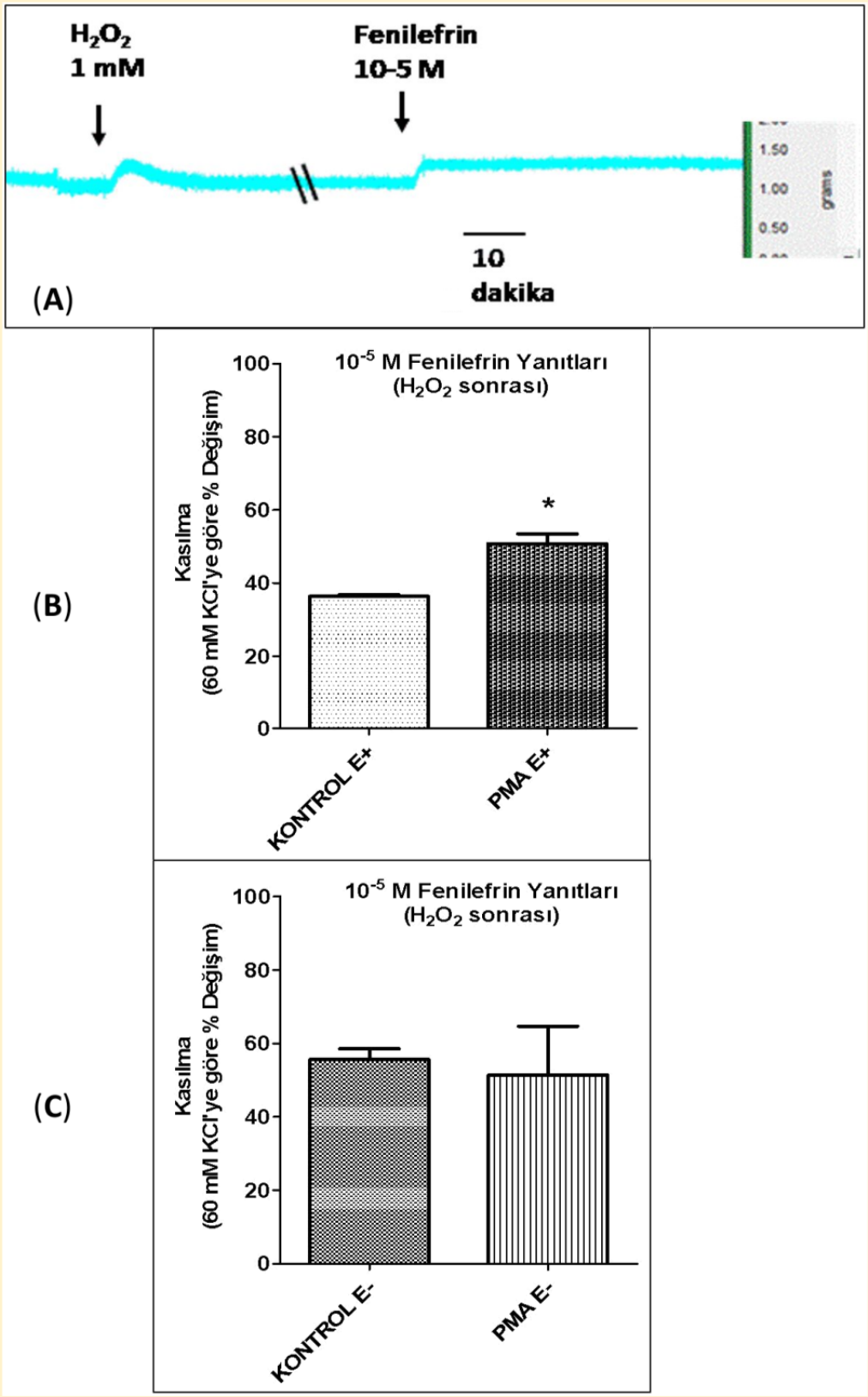


Şekil 4.5 Maximum doz KCl (120 mM) uygulamasının ardından, yıkama yapılmadan H_2O_2 deney küvetinin içine ok ile belirtilen zamanda eklenmiştir.

4.3. H_2O_2 ile Apoptoz Başlatılan Vasküler Dokuda PMA'nın Kasılma Yanıtlarına Etkisi

4.3.1. Apoptotik süreçlerde PMA'nın Etkisinin Fenilefrin Yanıtları Üzerinden İncelenmesi

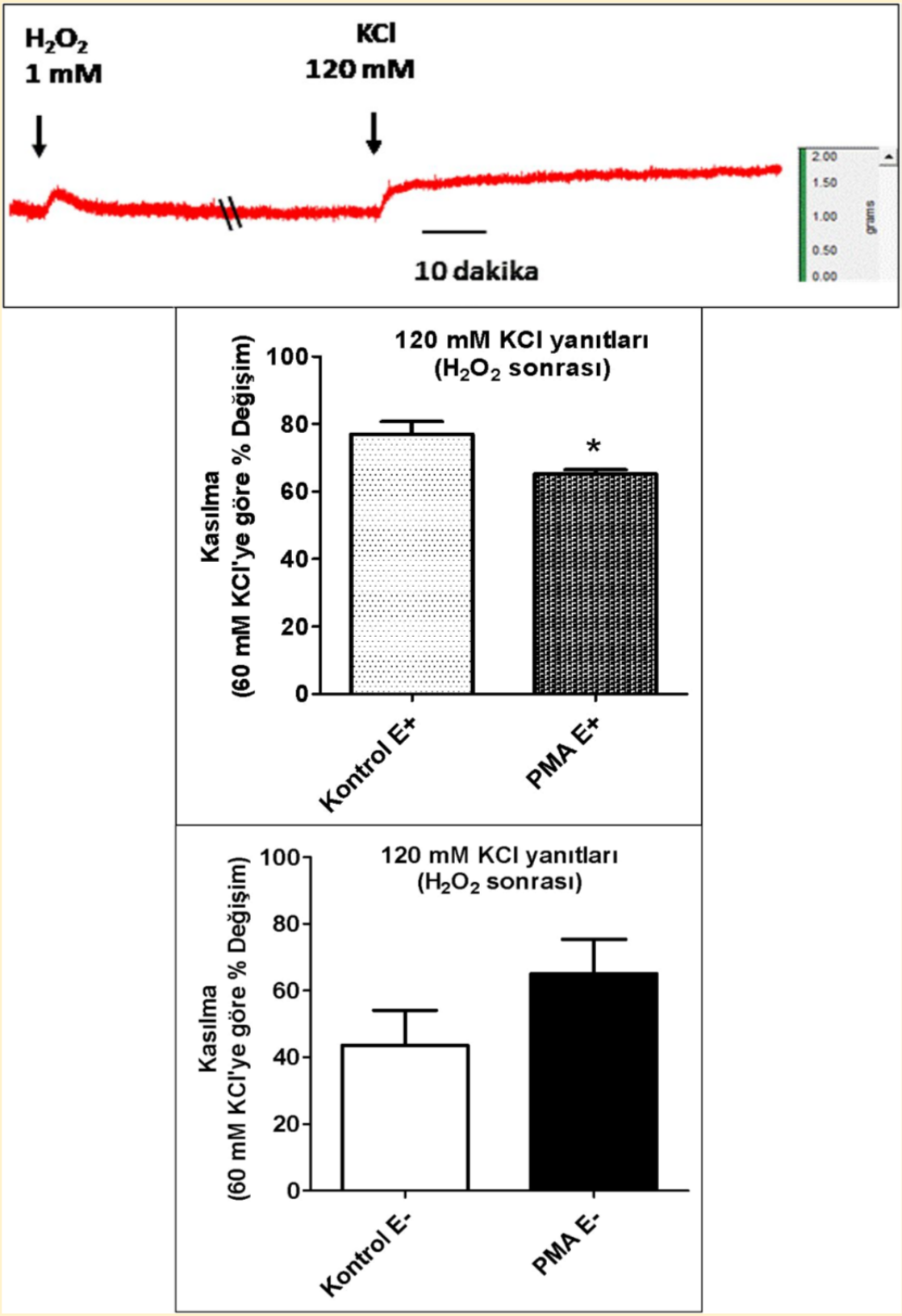
Dokularda apoptoz başlatabilmek için dokular H_2O_2 ile 40 dakika boyunca küvet ortamında inkübe edildi. Ardından ortama maksimum doz (10^{-5} M) fenilefrin eklendi (Şekil 4.6.A). H_2O_2 varlığında elde edilen kasılma yanıtları endotelli dokuda karşılaştırıldığında PMA grubunun yaklaşık %15 daha fazla olduğu gözlendi (Şekil 4.6.B). Aynı deney protokolü endotelsiz dokularda gerçekleştirildiğinde böyle bir fark gözlenmedi (Şekil 4.6.C).



Şekil 4.6. (**A**) PMA'nın kasılma yanıtlarına apoptotik süreçlerdeki etkisi. Dokular 40 dakika boyunca H_2O_2 ile inkübe edildiler, ardından 10^{-5} M Fenilefrin banyo küvetine eklendi. (**B**) Endotelli dokuda PMA grubu * $p<0,05$ kontrol grubu. İstatistiksel karşılaştırma student t-testi ile yapılmıştır. Analiz, ortalama ±SEM olarak gösterilmiştir. (**C**). Endoteli sıyrılmış kontrol ve PMA gruplarında H_2O_2'ye kasılma yanıtları.

4.3.2. Apoptotik Süreçlerde PMA'nın Etkisinin KCl Yanıtları Üzerinden İncelenmesi

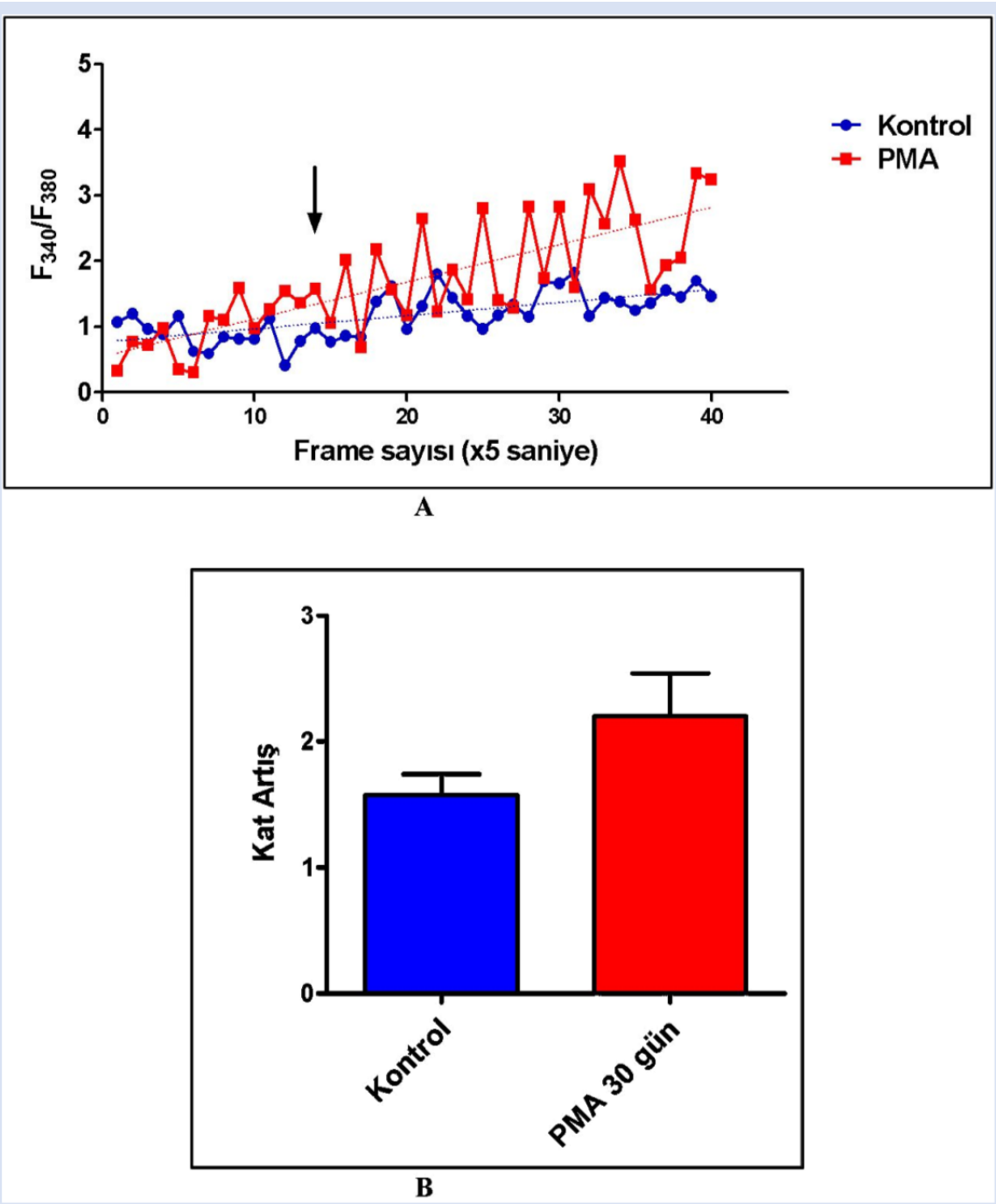
Dokularda apoptoz sürecinin başlatılması için 40 dakika boyunca H_2O_2 inkübasyonu yapıldı. Ardından ortama maksimum doz KCl (120 mM) eklendi (Şekil 4.7.A). H_2O_2 varlığında elde edilen kasılma yanıtları endotelli dokuda karşılaştırıldığında PMA grubunun kasılma yanıtlarının yaklaşık %10'luk bir azalma eğiliminde olduğu gözlendi (Şekil 4.7.B). Aynı deney protokolü endotelsiz dokularda gerçekleştirildiğinde böyle bir fark gözlenmedi (Şekil 4.7.C).



Şekil 4.7. (**A**) PMA'nın kasılma yanıtlarına apoptotik süreçlerdeki etkisi. Dokular 40 dakika boyunca H_2O_2 ile inkübe edildiler, ardından 120 mM KCl ile kasılması sağlandı. (**B**) Endotelli dokuda PMA grubu * $p<0,05$ kontrol grubu. İstatistiksel karşılaştırma student t-testi ile yapılmıştır. Analiz, ortalama ±SEM olarak gösterilmiştir. (**C**) Endoteli sıyrılmış kontrol ve PMA gruplarında H_2O_2'ye kasılma yanıtları.

4.4. Hücrede Ca^{+2} Sinyalinin Ölçümü

Ca^{+2}, vasküler düz kas hücre (VDKH)'lerin kasılması ve hücre homeostazının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu deneyde PMA'nın apoptotik süreçlerden kaynaklanan sitoplazmik Ca^{+2} sinyalleri üzerindeki etkisi incelendi. PMA'nın etkileri bir apoptoz indükleyici H_2O_2 ile test edildi. Ca^{+2} ölçümleri, H_2O_2'in arka plan flüoresans yoğunluğuna göre analiz edildi. PMA uygulanan grupta Ca^{+2} düzeyinin kontrol grubuna göre daha yüksek olma eğiliminde olduğunu gözlemlendi.



Şekil 4.8. VDKH'lerin 1 mM H_2O_2'ye karşı sitoplazmik Ca^{+2} sinyal yanıtları. A. 30 günlük PMA'ya maruz bırakılmış hayvanlardan (koyu mavi) ve kontrollerden (kırmızı) izole edilmiş VDKH'lere 13. Frame de H_2O_2 uygulanmıştır. B. Floresans yoğunluğunun arka plana göre kat artışı. H_2O_2 uygulamasından yaklaşık 150 saniye sonra her gruptaki hücrelerden alınan floresan yoğunluğu verilerinin ortalaması alınmıştır (4 hayvandan n = 6-7 hücre).

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında deney hayvanlarına 30 gün boyunca uygulanan PMA'nın H_2O_2 ile oluşturulan apoptotik etkileri, torasik aorta dokusunda oluşan kasılma yanıtları üzerinden incelendi.

5.1.Fenilefrin ve KCl için Kasılma Yanıtları

Deneylerde kasılma için gerekli uyarılar öncelikle Fenilefrin ve KCl ile oluşturularak, yanıtlar reseptör ve membran depolarizasyonu ile oluşan iki ayrı mekanizma üzerinden değerlendirildi. Hem KCl hem de Fenilefrin için % kasılma değerlerinin endotelsiz aorta preperatlarında daha büyük olduğu gözlendi (Şekil 4.1 ve 4.2). Nitrik oksit (NO)'nun gevşetici etkisinin oluşamadığı endotelsiz preperatlarda böyle bir sonuç literatür bilgisiyle de uyumludur (78).

5.2. PMA Uygulamasının Fenilefrin ve KCl Yanıtlarına Etkisi

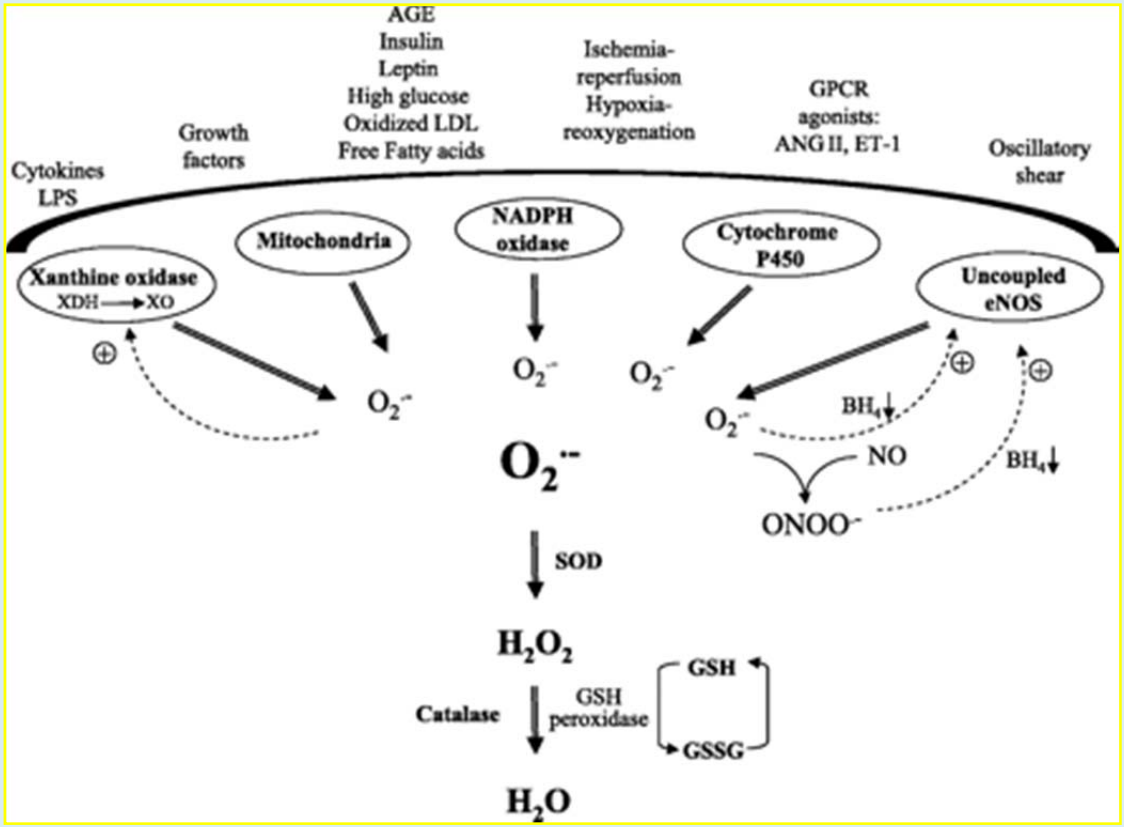
PMA gruplarının kasılma yanıtları PMA uygulanmamış kendi kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Ancak PMA gruplarında hem Fenilefrin hem de KCl uyarımına verilen maksimum yanıtların bir miktar azaldığı Şekil 4.1 ve 4.2 gözlendi. Değişik frekanslarda uygulanan pulslu manyetik alan farklı etkiler oluşturmaktadır. 50 Hz frekansındaki PMA vasküler düz kas kasılmasının hızlı ve yavaş bileşenlerini arttırır ve yavaş bileşenin maksimum kasılma değerine ulaşma zamanını kısaltır. Ayrıca 8 Hz frekansındaki PMA kasılmanın hızlı bileşenini düşürür ve yavaş bileşenin maksimum kasılma değerine ulaşmasını zayıflatır. Bir başka açıklamada ise 50 Hz frekansındaki PMA gastrik düz kas hücresinde sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonunda önemli artışa neden olur, 8 Hz frekansındaki PMA ise ufak değişimlere yol açar.

5.3.Vazoaktif Ajan H_2O_2 Varlığında Hücre İçi Ca^{+2} ve Kasılma Yanıtları

Oksijenin hücreler tarafından metabolize edilmesi sırasında zararlı reaktif oksijen türleri (ROS) açığa çıkar. Fizyolojik koşullarda, oksidanların oluşumu ile eliminasyon oranı dengededir. Ancak prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki bir

dengesizlik, oksidatif stres ile sonuçlanır ki, kardiyovasküler hastalıklar da dâhil birçok patolojik durumda gözlenmiştir (Şekil 5.1).

Hem endotel hem de düz kas hücrelerinde kendiliğinden ya da çeşitli uyaranlar nedeniyle H_2O_2 gibi reaktif oksijen türleri üretilir. H_2O_2, üretim alanının yakınında lokal olarak hareket edebilir veya yüklenmemiş bir molekül olduğundan hücre zarı boyunca yayılır ve komşu hücrelere etki eder (79-81).



Şekil 5.1. Moleküler oksijenin (O2-) bir elektron indirgenmesi olarak tanımlanan süperoksit anyonu, vasküler düz kas ve endotel hücreleri de olmak üzere gibi tüm hücre tiplerinde bir çok farklı enzim (örn., NADPH oksidaz, ksantinoksidaz, siklooksijenazlar, NO sentazlar, sitokrom P450 monooksigenazlar, mitokondrial solunum zincirinin enzimleri) tarafından üretilebilir (75). Süperoksit, kendiliğinden veya enzimatik olarak süperoksit dismutaz (SOD) tarafından yüksüz H_2O_2'ye indirgenir. H_2O_2 katalaz enzimi veya glutatyon peroksidaz ile su ve oksijene dönüşmesidir. Geçiş metalleri (bakır, demir) veya süperoksit anyon varlığında ise H_2O_2, Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonu vasıtasıyla yüksek reaktif hidroksil radikallerini (OH-) oluşturur (76).

H_2O_2 çeşitli doku tiplerinde deney koşullarına bağlı olarak vasorelaksan veya vasokonstriktif etkide bulunabilir (82,83). Literatürde H_2O_2 indüklü kasılmayı açıklamaya yönelik çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Bu mekanizmalardan bazıları;

H_2O_2'nin doğrudan pürinerjik reseptörlerin aktivasyonuna neden olması (84), Fosfolipaz C enzim (PLC) aktivasyonu ile kasılmanın gerçekleşmesi spesifik olmayan katyon kanalları aracılığı ile hücre içine doğru Ca^{+2} girişi (85) veya Cyclooxygenaz, mitojen-aktive protein kinase (MAPK), ekstraselüler sinyal-regüle kinaz ERK, Rho kinaz ve Src gibi düz kasta kasılmayı düzenleyen proteinler tarafından indüklenmesi yer almaktadır (86).

5.4. H_2O_2 Uyarısının Hücre İçi Ca^{+2} Değişimine Etkisi

Kasılma mekanizmalarının oluşmasında, sürdürülmesinde ve kontrolünde hücre içindeki sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişimler önemli bir yer tutmaktadır (87). Bu nedenle hem kontrol hem de PMA grubundan izole edilen düz kas hücreleri fura-2 AM ile yüklendi ve sitoplazmadaki Ca^{+2} konsantrasyon değişimi görüntülendi

Yaptığımız ölçümlerde hücrelere H_2O_2 uygulaması ile hem kontrol hem de PMA grubunda hücre içindeki Ca^{+2} konsantrasyonunda bir artış gözlemlendi. PMA grubunun yanıt artışı ise Kontrol grubuna göre daha büyük oldu (Şekil 4.8).

5.5. H_2O_2'nin Aortta Oluşturduğu Kasılma Yanıtlarının Ölçümü

Ca^{+2} deneylerinin ardından çalışmamızda H_2O_2'nin aortta oluşturduğu kasılma yanıtlarını ölçtük. Torasik aorta halkalarına doğrudan 1 mM H_2O_2 uyguladığımızda, uyarımın devam etmesine rağmen kasılmanın transient bir şekilde geliştiği gözlendi.

H_2O_2 transient kasılmaları istatistiksel olarak incelendiğinde endotelli ve endotelsiz dokuda anlamlı bir fark görünmedi ancak ortalamalar karşılaştırıldığında H_2O_2'nin endotelli dokunun kasılma ortalamasını bir miktar arttırdığı gözlendi. Bu sonuç literatür verisi ile de uyumludur (88). İskelet kası arteriollerinde yapılan çalışmada uygulanan H_2O_2 konsantrasyonuna bağlı olarak Endotelin düz kas üzerinde kontraktif etkisi de gösterilmiş bir olgudur (Şekil 5.2) (89).

Çalışmamızda Endotelli PMA grubunda kasılmaların ise önemli miktarda azaldığı gözlendi (Şekil 4.3). H_2O_2'nin kontrol endotelli grupta kasılma ortalamasını büyütmüş ve düz kas hücrelerinde sitoplazmik Ca^{+2} konsantrasyonunu arttırmış olmasına rağmen kasılma yanıtının azalmış olması PMA'nın hücresel etkisini aydınlatılmasını gerektirmektedir. Bu durumda önerilecek olası bir açıklama PMA uygulamasının NO düzeyini arttırması olabilir (90).

Bir başka açıklama cGMP ve cAMP üzerinden kontraktil elemanların Ca^{+2}'a duyarlılığını değiştirmesi olabilir (91). PMA'nın farklı tipteki hücrelerde etkisini cAMP üzerinden gösterdiğini işaret eden çalışmalar mevcuttur (92-94).

5.6. Fenilefrin Üzerine eklenen H_2O_2 Yanıtlarına PMA Etkisi

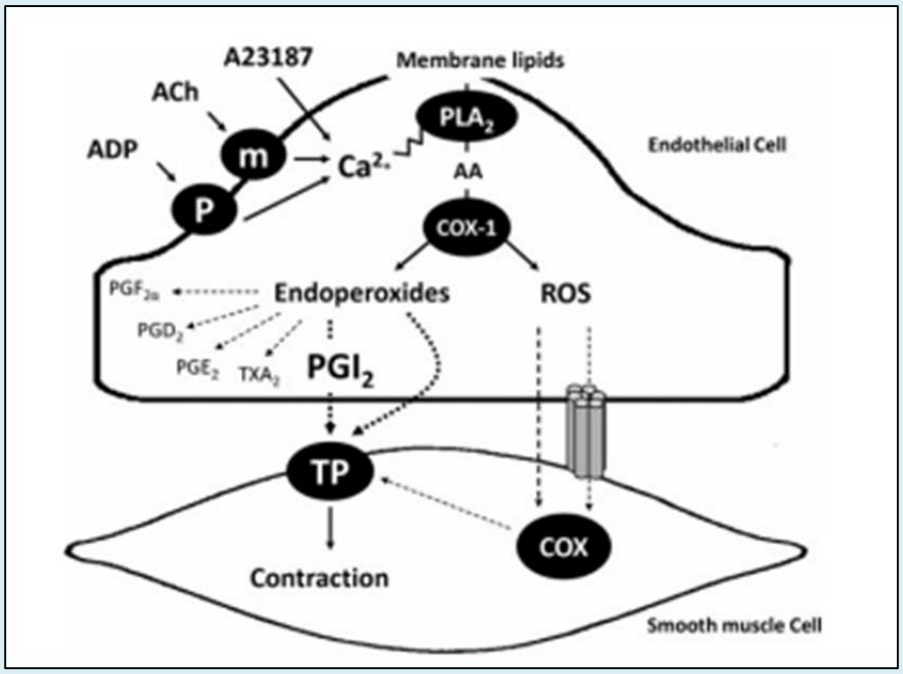
Şekil 4.4 de fenilefrin üzerine H_2O_2 uyguladığımızda kasılmada önce bir transient artış ardından dokuda bir gevşeme gözlendi. Fenilefrin varlığında gelişen bu yanıt H_2O_2 gevşetme etkisini hem endotel mekanizmalarıyla hem de doğrudan düz kastaki K^+ kanalarının (voltaj ve Ca^{+2} bağımlı) katkıları ile geçekleştirdiği gösterilmiştir (95).

Transient artışlar karşılaştırıldığında ise endotelli PMA grubunda artış gözlendi. Maksimum doz Fenilefrinin (10^{-5} M) maksimum doz uygulaması sitoplazmada önemli derecede Ca^{+2} birikimine neden olacaktır. Ayrıca yanıta eklenen H_2O_2 ile birlikte PLC veya spesifik olmayan katyon kanalları da devreye girecektir ve kalsiyum konsantrasyonunun daha fazla artmasına neden olacaktır. Yapılan çalışmalarda ortamdaki Ca^{+2}'un bu kadar yüksek kaldığı durumlarda endotel den kasılma faktörlerinin salınmasına neden olduğu ve bu durumun yaşlanma, diyabet hipertansiyon gibi hastalıklarda artan endotel disfonksiyonu ile sonuçlandığı bildirilmiştir (96). Şekil 5.2. Ayrıca sitoplazmada yüksek Ca^{+2} konsantrasyonun apoptozu tetiklediği de gösterilmiştir (97).

Fizyolojik olmayan Ca^{+2} yanıtlarında endotelden salınan kasılma faktörleri PMA grubunda artan kasılma miktarlarını açıklayabilir. Hasarlı endotel hücreleri apoptoza giderek endotelin rejenerasyonuna olanak tanırlar (98).

PMA uygulaması endotelin apoptoza gitmesini kolaylaştıracak bir yapıyı örneğin NO salınımını sağlayan proteinleri bir şekilde düzenleyerek etkilemiş olabilir.

Şekil 4.5 te KCl uyarısı devam ederken, küvete eklenen H_2O_2 tüm gruplar için sadece küçük bir artışa neden oldu. Yeni bir artışa sebep olmaması artışlarda reseptör aktivasyonun gerekliliğini işaret edebilir. H_2O_2'nin 40 dakikalık inkübasyonu sonucu erken apoptoz yapılan dokularda elde edilen fenilefrin kasılma yanıtlarında yine PMA grubunda artış gözlendi (Şekil 4.6). Fenilefrin yanıtının bir parçasını oluşturan Inositol 1,4,5-trifosfat reseptörlerinin apoptozun kritik düzenleyicisi olabileceğini ve ilaç araştırmalarında önemli bir hedef olabileceğini belirten çalışmalar bulunmaktadır (99).



Şekil 5.2. Endotel bağımlı kasılmaların ortaya çıkmasına yol açan mekanizmalar. Zincirin başlangıç noktası önce anormal hücre içi kalsiyum artışıdır (100).

Şekil 4.5 te KCl uyarısı devam ederken, küvete eklenen H_2O_2 tüm gruplar için sadece küçük bir artışa neden oldu. Yeni bir artışa sebep olmaması artışlarda reseptör aktivasyonun gerekliliğini işaret edebilir. H_2O_2'nin 40 dakikalık inkübasyonu sonucu erken apoptoz yapılan dokularda elde edilen fenilefrin kasılma yanıtlarında yine PMA grubunda artış gözlendi (Şekil 4.6). Fenilefrin yanıtının bir parçasını oluşturan Inositol 1,4,5-trifosfat reseptörlerinin apoptozun kritik düzenleyicisi olabileceğini ve ilaç araştırmalarında önemli bir hedef olabileceğini belirten çalışmalar bulunmaktadır (101).

Yine H_2O_2 ile 40 dakikalık erken apoptoz oluşturulan dokularda KCl uyarısında kontrol grupları için endotel varlığında kasılabilirliğin daha fazla olduğu görülmüştür. Ancak bu fark PMA Endotel grubunda bir miktar az olmasında PMA'nın apoptotik yanıtları indüklemesinde reseptör aracılı aktivasyonun önemini işaret ettiği düşündürmektedir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında fizyolojik koşullarda PMA uygulamasının H_2O_2 indüklü kasılma yanıtlarına NO salınımını arttırıcı yönde bir katkısı olduğunu düşündüren bulgular içermektedir. Ancak reseptör aracılı uyarılarla oluşturulan anormal fizyolojik koşullarda H_2O_2'nin endoteli sağlam PMA grubunda kasılma yanıtlarını arttırması, daha çok patolojik koşullarda gözlenen endotel aracılı kasılma faktörlerinin

düz kasa salınımını işaret etmektedir. H_2O_2 inkübasyonu ile oluşturulan erken apoptoz koşullarında yine artan PMA endotel grubu kasılmaları bu düşünceyi desteklemektedir.

KAYNAKLAR

1. **Krebs J, Saremaslani P, Caduff R.** ALG-2: a Ca^{2+}-binding modulator protein involved in cell proliferation and in cell death. Biochim Biophys Acta. 1600 (1–2), 68–73, **2002.**

2. **Tsujimoto Y.** Role of Bcl-2 family of proteins in apoptosis, apoptosomes or mitochondria? Genes Cell 1998; 3: 697-707.

3. **Taneja N, Tjalkens R, Philbert MA, Rehemtulla A.** Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system. Oncogene. **2001**; 20(2): 167-77.

4. **Lane D.** P53 guardian of genome. Nature **1992**; 358: 15-16.

5. **Miao X, Yin S, Shao Z, Zhang Y, Chen X.** Nanosecond pulsed electric field inhibits proliferation and induces apoptosis in human osteosarcoma. J Orthop Surg Res. **2015** Jul 7; 10:104. doi: 10.1186/s13018-015-0247-z.

6. **Wang Q, Wu W, Chen X, He C, Liu X.** [Effect of pulsed electromagnetic field with different frequencies on the proliferation, apoptosis and migration of human ovarian cancer cells]. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. **2012** Apr; 29(2):291-5.

7. **Kaszuba-Zwoinska J, Chorobik P, Juszczak, Zaraska W, Thor P.J.** Pulsed electromagnetic field affects intrinsic and endoplasmatic reticulum apoptosis induction pathways in MonoMac6 cell line culture. J Physiol Pharmacol. **2012** Oct;63(5):537-45.

8. **Crocetti S, Piantelli F, Leonzio C.** Selective destabilization of tumor cells with pulsed electric and magnetic sequences: a preliminary report. Electromagn Biol Med. **2011** Sep;30(3):128-35. doi: 10.3109/15368378.2011.596247.

9. **Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan.** FASEB J. **1992** Apr;6(7):2397-404.

10. **Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Stroke. 2009** May; 40(5): e331-9. doi: 10.1161/STROKE AHA.108.531632.

11. **Naidoo N.** ER and aging—Protein folding and the ER stress response. Ageing Research Reviews 8 (**2009**) 150–159.

12. **Günay, İ. 2008.** Manyetik Alan Kaynakları ve İndüklenmiş Alanlar. Ders notları.

13. http://www.accelinstruments.com/Helmholtz-Coil/Helmholtz-Coil.html.

14. **Cadossi R, and Setti S.** The role of physical forces in the management of bone and cartilage diseases and bone consolidation. Aging Clinical and Experimental Research, vol. 23, no. 2, pp. 49–51, 2011.

15. **Fini M, Pagani S, Giavaresi G, et al.** Functional tissue engineering in articular cartilage repair: is there a role for electromagnetic biophysical stimulation? Tissue Engineering Part B: Reviews, vol. 19, no. 4, pp. 353–367, **2013.**

16. **Di Lazzaro V, Capone F, Apollonio F, et al.** A consensus panel review of central nervous system effects of the exposure to low-intensity extremely low-frequency magnetic fields. Brain Stimulation, vol. 6, no. 4, pp. 469–476, 2013.

17. **Grant G, Cadossi R, and Steinberg G.** Protection against focal cerebral ischemia following exposure to a pulsed electromagnetic field. Bioelectromagnetics, vol. 15, no. 3, pp. 205–216, **1994.**

18. **Cadossi R, and Setti S.** The role of physical forces in the management of bone and cartilage diseases and bone consolidation. *Aging Clinical and Experimental Research*, vol. 23, no. 2, pp. 49– 51, **2011.**

19. **Lin H Y, and Lin Y J.** In vitro effects of low frequency electromagnetic fields on osteoblast proliferation and maturation in an inflammatory environment. *Bioelectromagnetics*, vol. 32, no. 7, pp. 552–560, **2011.**

20. **Sollazzo V, Palmieri A, Pezzetti F, Massari L, and Carinci F.** Effects of pulsed electromagnetic fields on human osteoblast- like cells (MG-63): A Pilot Study. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 468, no. 8, pp. 2260–2277, **2010.**

21. **Crocetti S, Beyer C, Schade G, Egli M, Fro¨hlich J, and Franco-Obrego´n A.** Low intensity and frequency pulsed electro- magnetic fields selectively impair breast cancer cell viability. *PLoS ONE*, vol. 8, no. 9, Article ID e72944, **2013.**

22. **Jime´nez-Garc´ıa M. N, Arellanes-Robledo J, Aparicio- Bautista D. I, Rodr´ıguez-Segura M. T, Villa-Trevin˜o S, and Godina-Nava J. J.** Anti-proliferative effect of extremely low frequency electromagnetic field on preneoplastic lesions formation in the rat liver. *BMC Cancer*, vol. 10, article no. 159, **2010.**

23. **Vincenzi F, Targa M, Corciulo C, et al.** The anti-tumor effect of A3 adenosine receptors is potentiated by pulsed electro- magnetic fields in cultured neural cancer cells PLoS ONE, vol. 7, no. 6, Article ID e39317, **2012.**

24. **Rohde C, Chiang A, Adipoju O, Casper D, and Pilla A. A.** Effects of pulsed electromagnetic fields on interleukin-1β and postoperative pain: a double-blind, placebo-controlled, pilot study in breast reduction patients. Plastic and Reconstructive Surgery, vol. 125, no. 6, pp. 1620–1629, **2010.**

25. **Lim S, Kim S.-C, and Kim J. Y. O.** Protective effect of 10- Hz, 1-mT electromagnetic field exposure against hypoxia/reoxy- genation injury in HK-2 cells. *Biomedical and Environmental Sciences*, vol. 28, no. 3, pp. 231–234, **2015.**

26. **Formica D, Silvestri S. 2004**. Biological effects of exposure to magnetic resonance imaging: an overview. Biomed Eng Online, 22;3:11.

27. **Schaefer DJ, Bourland JD, Nyenhuis JA. 2000.** Review of patient safety in time-varying gradient fields. J Magn Reson Imaging,12(1):20-9.

28. **Klabunde R.E.** Cardiovascular Physiology Concepts. http://www.CVphysiology.com.

29. **Pall ML. 2013.** "Electromagnetic fields act via activation of voltage-gated calcium channels to produce beneficial or adverse effects", J Cell Mol Med.,17(8):958-65.

30. **Napoli C, Paolisso G, Casamassimi A, Al-Omran M, Barbieri M, Sommese L, Infante T, Ignarro LJ. 2013.** Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights", J Am Coll Cardiol., 62(2):89-95.

31. **Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. **1972**; 26: 239-57.

32. **Searle J, Kerr JF, Bishop CJ.** Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. Pathol Annu. **1982**; 17: 229-259.

33. **Thompson EB.** Apoptosis and steroid hormones. Mol Endocrinol. **1994**; 8: 665-73.

34. **Günay I. and Mert T. 2011.** Pulsed Magnetic Fields Enhance the Rate of Recovery of Damaged Nerve Excitability. Bioelectromagnetics 32: 200-208.

35. **Yuan Y, Wei L, Li F, Guo W, Li W, Luan R, Lv A, Wang H. 2010.** Pulsed magnetic field induces angiogenesis and improves cardiac function of surgically induced infarcted myocardium in Sprague-Dawley rats. Cardiology.; 117(1):57-63.

36. **Kudo TA, Kanetaka H, Shimizu Y, Abe T, Mori H, Mori K, Suzuki E, Takagi T, Izumi S. 2013.** Induction of neuritogenesis in PC12 cells by a pulsed electromagnetic field via MEK-ERK1/2 signaling. Cell Struct Funct., 38(1):15-20.

37. Bai WF, Xu WC, Feng Y, Huang H, Li XP, Deng CY, Zhang MS. 2013. Fifty-Hertz electromagnetic fields facilitate the induction of rat bone mesenchymal stromal cells to differentiate into functional neurons. Cytotherapy. 15(8):961-70.

38. **Li Q, Cheng D, Chen R, Cai Q, Jia N, Su Q, Zhang H, Zhu Z, Zeng J, Li H. 2014.** Expression of neurogranin in hippocampus of rat offspring exposed to restraint stress and pulsed magnetic fields. Brain Res.,1570: 26-34.

39. **Morris C, Skalak T. 2005.** Static magnetic fields alter arteriolar tone in vivo. Bioelectromagnetics.,1-9.

40. **Okano H1, Ohkubo C. 2001.** Modulatory effects of static magnetic fields on blood pressure in rabbits", Bioelectromagnetics, 408-18.

41. **Miao X, Yin S, Shao Z, Zhang Y, Chen X. 2015**. Nanosecond pulsed electric field inhibits proliferation and induces apoptosis in human osteosarcoma. J Orthop Surg Res., 104.

42. **Wang Q, Wu W, Chen X, He C, Liu X. 2012.** Effect of pulsed electromagnetic field with different frequencies on the proliferation, apoptosis and migration of human ovarian cancer cells. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi., 291-5.

43. **Kaszuba-Zwoinska J, Chorobik P, Juszczak, Zaraska W, Thor P.J. 2012.** Pulsed electromagnetic field affects intrinsic and endoplasmic reticulum apoptosis induction pathways in MonoMac6 cell line culture. J Physiol Pharmacol, 537-45.

44. **Crocetti S, Piantelli F, Leonzio C. 2011.** Selective destabilization of tumor cells with pulsed electric and magnetic sequences: a preliminary report. Electromagn Biol Med.,128-35.

45. **Grassi C, D'Ascenzo M, Torsello A, Martinotti G, Wolf F, Cittadini A, Azzena GB. 2004.** Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated Ca2+ channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. Cell Calcium, 307-15.

46. **Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. 2009.** Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. Stroke. e331-9.

47. **Pall ML. 2013.** Electromagnetic fields act via activation of voltage-gated calcium channels to produce beneficial or adverse effects. J Cell Mol Med.,17(8):958-65.

48. **Pilla AA. 2012.** Electromagnetic fields instantaneously modulate nitric oxide signaling in challenged biological systems. Biochem Biophys Res Commun, 330-3.

49. **Barbier E1, Dufy B, Veyret B. 1996.** Stimulation of Ca2+ influx in rat pituitary cells under exposure to a 50 Hz magnetic field. Bioelectromagnetics, 303-11.

50. **Rao P. 2008.** Role of MRI in paediatric neurooncology. Eur J Radiol., 259-70.

51. **Naidoo N. 2009.** Cellular stress/the unfolded protein response: relevance to sleep and sleep disorders. Sleep Med Rev.,195-204

52. **Girolami A, Treleani M, Bonamigo E, Tasinato V, Girolami B. 2013.** Venous thrombosis in rare or unusual sites: a diagnostic challenge. Semin Thromb Hemost. 2014 Feb;40(1):81-7. doi: 10.1055/s-0033-1363471.

53. **Kubat NJ, Moffett J, Fray LM. 2015.** Effect of pulsed electromagnetic field treatment on programmed resolution of inflammation pathway markers in human cells in culture. J Inflamm Res., 8:59-69.

54. **Li HL, Huang XP, Zhou XH, Ji TH, Wu ZQ, Wang ZQ, Jiang HY, Liu FR, Zhao T. 2011.** Correlation of seven biological factors (Hsp90a, p53, MDM2, Bcl-2, Bax, Cytochrome C, and Cleaved caspase3) with clinical outcomes of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma, Biomed Environ Sci., 630-41.

55. **Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR**. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. **1972**; 26: 239-57.

56. **Searle J, Kerr JF, Bishop CJ.** Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. Pathol Annu. **1982**; 17: 229-259.
57. **Thompson EB.** Apoptosis and steroid hormones. Mol Endocrinol. **1994**; 8: 665-73.

58. **Chang L, Graham P H, Hao J, Ni J, Bucci J, Cozzi P J, Kearsley J H and Li Y.** PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors enhance radiosensitivity in radioresistant prostate cancer cells through inducing apoptosis, reducing autophagy, suppressing NHEJ and HR repair pathways. Cell Death and Disease (**2014**) **5**, e1437; doi:10.1038/cddis.2014.415

59. http://www.cvphysiology.com/Blood%20Flow/BF011#Diseases_or_Conditions.

60. **Benfeitas R , Uhlen M, Nielsen J, Mardinoglu A.** New Challenges to Study Heterogeneity in Cancer Redox Metabolism. Front Cell Dev Biol. **2017** Jul 11;5:65.

61. **Griendling, K.K., Sorescu, D. & Ushıo-Fukaı, M. (2000).** Nad(P)H Oxidase: Role İn Cardiovascular Biology and Disease. Circ. Res., 86, 494–501.

62. **Hibino, M, Okumura, K, Iwama, Y, Mokuno, S, Osanaı, H, Matsuı, H, Tokı, Y. & Ito, T. (1999).** Oxygen-Derived Free Radical-İnduced Vasoconstriction by Thromboxane A_2 İn Aorta of the Spontaneously Hypertensive Rat. J. Cardiovasc. Pharmacol., 33, 605 – 610.

63. **Fujimoto, S, Asano, T, Sakai, M, Sakuraı, K, Takagı, D, Yoshımoto, N. & Itoh, T. (2001).** Mechanisms of Hydrogen Peroxide- İnduced Relaxation İn Rabbit Mesenteric Small Artery. Eur. J. Pharmacol., 412, 291–300.

64. **Yang, ZW, Zhang A, Altura, B.T. & Altura, B.M. (1998a).** Endothelium-dependent relaxation to hydrogen peroxide in canine basilar artery a potential new cerebral dilator mechanism. Brain Res. Bull., 47, 257–263.

65. **Yang, Z.W., Zheng, T., Zhang, A., Altura, B.T. & Altura, B.M. (1998b).** Mechanisms of hydrogen peroxide-induced contrac- tion of rat aorta. Eur. J. Pharmacol., 344, 169–181.

66. **Gao Y-J, Zhang Y, Hirota S, Janssen L-J, &*Robert, Lee M-K-W. 2003.** Vascular relaxation response to hydrogen peroxide is impaired in hypertension. British Journal of Pharmacology 142, 143–149.

67. **Gao Y-J, Zhang Y, Hirota S, Janssen L-J, &*Robert, Lee M-K-W. 2003.** Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. British Journal of Pharmacology 138, 1085–1092 142, 143–149.

68. **Vandecaetsbeek I, Vangheluwe P, Raeymaekers L, Wuytack F, Vanoevelen J.** The Ca^{2+} pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Cold Spring Harb Perspect Biol (**2011)** 3(5): a004184. doi:10.1101/cshperspect.a004184

69. **Kania E, Pajak B, Orzechowski A.** Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells. Biomed Res Int (**2015**) 2015:352794. doi:10.1155/2015/352794.

70. **Mekahli D, Bultynck G, Parys JB, De Smedt H, Missiaen L.** Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol (**2011**) 3(6): a004317. doi:10.1101/cshperspect. a004317.

71. **Krebs J, Agellon LB, Michalak M.** Ca^{2+} homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: an integrated view of calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun* (**2015**) 460(1):114–21. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.004

72. **Yuan Y, Wei L, Li F, Guo W, Li W, Luan R, LV A, Wang H.** Pulsed magnetic field induces angiogenesis and improves cardiac function of surgically induced infarcted myocardium in Sprague-Dawley rats. Cardiology. **2010**; 117(1):57-63. doi: 10.1159/000321459.

73. **Kudo TA, Kanetaka H, Shimizu Y, Abe T, Mori H, Mori K, Suzuki E, Takagi T, Izumi S.** Induction of neuritogenesis in PC12 cells by a pulsed electromagnetic field via MEK-ERK1/2 signaling. Cell Struct Funct. **2013**; 38(1):15-20.

74. **Bai WF, Xu WC, Feng Y, Huang H, Li XP, Deng CY, Zhang MS.** Fifty-Hertz electromagnetic fields facilitate the induction of rat bone mesenchymal stromal cells to differentiate into functional neurons. Cytotherapy. **2013** Aug; 15(8):961-70.

75. **Li Q, Cheng D, Chen R, Cai Q, Jia N, Su Q, Zhang H, Zhu Z, Zeng J, Li H.** Expression of neurogranin in hippocampus of rat offspring exposed to restraint stress and pulsed magnetic fields. Brain Res. **2014** Jun 27; 1570: 26-34.

76. **Mert T, Gunay İ, Öcal I. 2010.** Neurobiological Effects of Pulsed Magnetic Field on Diabetes-Induced Neuropathy. Bioelectromagnetics 31:39^47.

77. **Mert T, Gunay İ, Öcal I. 2011.** Pulsed Magnetic Fields Enhance the Rate of Recovery of Damaged Nerve Excitability. Bioelectromagnetics 32:200 ^208.
78. **Feletou M, Köhler R, Vanhoutte P. 2012.** Nitric oxide: Orchestrator of endothelium-dependent responses. Journal Annals of MedicineVolume 44.

79. **Martynyuk V, Melnyk M, & Artemenko A.** Comparison of biological effects of electromagnetic fields with pulse frequencies of 8 and 50 Hz on gastric smooth muscles. Journal Electromagnetic Biology and Medicine Volume 35, **2016.**

80. **Li J, Shah A. M.** Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology Published 1 November **2004** Vol. 287 no. 5, R1014-R1030

81. **Félétou M.** The Endothelium. **2011**.

82. **Sundquist T.** Bovine aortic endothelial cells release hydrogen peroxide. J Cell Physiol. 148: pp. 152–6, **1991**. 10.1002/jcp.1041480118

83. **Trebak M, Ginnan R, Singer HA, Jourd'heuil D.** Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm.

84. **Trebak M, Ginnan R, Singer HA.** Jourd'heuil D. Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling. Antioxid Redox Signal. **2010** Mar 1;12(5):657-74.

85. Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. Cardiovasc Res. 68: pp. 26–36, **2005**. 10.1016/j.cardiores.2005.06.021.

86. Shen J-Z, Zheng X-F, Kwan C-Y. Evidence for P2-purinoceptors contribution in H2O2-induced contraction of rat aorta in the absence of endothelium. Cardiovasc Res (**2000**) 47 (3): 574-585.

87. **Sato H, Takeo T, Liu Q, Nakano K, Osanai T, Suga S, Wakui M, and Wu J.** Hydrogen peroxide mobilizes $Ca2^{+}$ through two distinct mechanisms in rat hepatocytes. Acta Pharmacol Sin. **2009** Jan; 30(1): 78–89.

88. **Thakali K, Davenport L, Gregory D. Fink and Stephanie W. Watts.** Cyclooxygenase, p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), Extracellular Signal-Regulated Kinase MAPK, Rho Kinase, and Src Mediate Hydrogen Peroxide-Induced Contraction of Rat Thoracic Aorta and Vena Cava. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics January **2007**, 320 (1) 236-243;

89. Berridge M-J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. The Journal of Physiology. **2008.**

90. **Ana Bele´n G-R, Briones A. M, Beltra´n A. E, Alonso M. J, Simonsen U, and Salaices M.** Hypertension Increases Contractile Responses to Hydrogen Peroxide in Resistance Arteries through Increased Thromboxane A2, Ca2, and Superoxide Anion Levels. The Journal of Pharmacology and Experımental Therapeutıcs. **2008**.

91. Csató V, Pető A, Koller A, Édes I, Tóth A, Papp Z. Hydrogen Peroxide Elicits Constriction of Skeletal Muscle Arterioles by Activating the Arachidonic Acid Pathway. Plos one. **2014.**

92. **Bragin DE[1], Statom GL, Hagberg S, Nemoto EM.** Increases in microvascular perfusion and tissue oxygenation via pulsed electromagnetic fields in the healthy rat brain. J Neurosurg. **2015** May;122(5):1239-47.

93. **Nishimura j, Breemen C.** Direct regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. Biochemical and Biophysical Research Communications. **1985**.

94. **Cain CD, Adey WR, Luben RA.** Evidence that pulsed electromagnetic fields inhibit coupling of adenylate cyclase by parathyroid hormone in bone cells. J Bone Miner Res. **1987** Oct;2(5):437-41.

95. **Farndale RW, Murray JC.** Pulsed electromagnetic fields promote collagen production in bone marrow fibroblasts via athermal mechanisms. Calcif Tissue Int. **1985** Mar;37(2):178-82.

96. **Lekhraj R[1], Cynamon DE, DeLuca SE, Taub ES, Pilla AA, Casper D.** Pulsed electromagnetic fields potentiate neurite outgrowth in the dopaminergic MN9D cell line. J Neurosci Res. **2014** Jun;92(6):761-71.

97. **Paul M. Vanhoutte, MD, PhD.** Endothelial Dysfunction the First Step Toward Coronary Arteriosclerosis. Circ J **2009**; 73: 595 – 601.

98. **Tripathi A[1], Chaube SK.** High cytosolic free calcium level signals apoptosis through mitochondria-caspase mediated pathway in rat eggs cultured in vitro. Apoptosis. **2012** May;17(5):439-48.

99. **Paul M, Vanhoutte and Eva H. C, Tang J.** Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad! J Physiol 586.22 (**2008**) pp 5295–5304.

100. **Gao Y-J, and Robert M K W Lee.** Hydrogen peroxide is an endothelium-dependent contracting factor in rat renal artery. Br J Pharmacol. **2005** Dec; 146(8): 1061–1068.

101. **Suresh K. Joseph · Gyo¨rgy Hajno´czky.** IP3 receptors in cell survival and apoptosis: Ca2+ release and beyond. Apoptosis (**2007**) 12:951–968**.**

ÖZGEÇMİŞ

21/04/1987 yılında Mersin'de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimimi Mersin'de tamamladı. 2010 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü'nde Lisans öğrenimine başladı. 2011 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde çift ana dal programına başladı. 2013 yılında Fizik bölümünden fakülte birincisi olarak mezun oldu. 2014 yılında Kimya bölümünden mezun oldu. 2014 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Biyofizik Anabilim Dalında tezli yüksek lisans programına başladı. 2014 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde Fizik Anabilim Dalında tezli yüksek lisans programına başladı. 2017 yılında tamamladı.