TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİYABETİK SIÇAN KALBİ KALSİYUM HOMEOSTAZINI DÜZENLEYEN MEKANİZMALARIN İNCELENMESİ

Nazmi YARAŞ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Belma TURAN

2007-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyofizik Doktora Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16/01/2007

Prof. Dr. Nuhan PURALI
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Belma TURAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Danışman

Prof. Dr. Mehmet UĞUR
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç.Dr. Babür ŞAHİNOĞLU
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç.Dr. Aslıhan KÖKSOY
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI ii
İÇİNDEKİLER iii
ÖNSÖZ v
SİMGELER VE KISALTMALAR vi
ŞEKİLLER vii
ÇİZELGELER x
1. GİRİŞ 1
1.1. Kalbin Genel Özellikleri 1
1.2. Kardiyomiyositlerde Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi 1
1.3. Ca^{2+} Uyarımlı Ca^{2+} Salınımı 3
1.3.1 Sarkoplazmik Retikulum ve Ryanodine Reseptörleri 5
1.4. *Diabetes Mellitus* 7
1.5. Diyabetik Kardiyomiyopati 9
1.6. Renin Anjiyotensin Sistemi 15
1.6.1. Anjiyotensin II Reseptörleri 16
1.6.2. Anjiyotensin II ve Diyabet İlişkisi 18
1.6.3. Oksidan Stress ve Diyabet İlişkisi 19
1.7. Çalışmanın Amacı 22
2. MATERYAL METOD 24
2.1. Deneysel Diyabetin Oluşturulması 24
2.2. Kardiyomiyositlerin Elde Edilmesi 24
2.3 L-tipi Ca^{2+} Kanal Akımı Ölçümü 25
2.4 Bazal ve Geçici Hücreiçi Ca^{2+} Değişimi (Ca^{2+} transient) Ölçümü 26
2.5. Lokal Ca^{2+} Salınımı (Ca^{2+} Spark) Ölçümü 27
2.6. Eşzamanlı Ca^{2+} Akımı ve ve Hücre İçi Serbest Ca^{2+} Derişimi Ölçümü 29
2.7. Protein Seviyesi Ölçümleri: Western Blot 30
2.7.1. RYR Protein Seviyesi ve Fosforilasyon Düzeyi 31
2.7.2. PKC Protein Seviyesi 31
2.7.3. Thiol oksidasyon ölçümü 32
2.8. İstatistiksel Analizler 32

2.9. Kullanılan Kimyasallar 32

3. BULGULAR 34

3.1. Hayvanların Genel Durumları 34

3.2. Deneysel Diyabetin Hücreiçi Ca^{2+} Homeostazına ve Ryanodin Reseptörlerine Etkisi 35

3.2.1 Diyabette L-Tipi Ca^{2+} Akımı ve Hücre İçi Serbest Ca^{2+} Derişimi 35

3.2.2 Diyabetik Kardiyomiyositlerde Hücre İçi Serbest Ca^{2+} Derişimi 36

3.2.3 Lokal Ca^{2+} Salınımı (Spark) ile İlgili Parametreler 38

3.2.4 RYR2 ve FKBP12.6 Protein Seviyeleri 40

3.3. Anjiyotensin ve Diyabet İlişkisi: AT_1 Reseptör Blokajının Hücreiçi Ca^{2+} Homeostazına Etkisi 41

3.3.1 Lokal Ca^{2+} Salınımı (Spark) ile İlgili Parametreler 42

3.3.2 Diyabetik Kardiyomiyositlerde Uyarılma-Kasılma Kazanç Faktörü 46

3.3.3 Western Blot Bulguları 51

3.3.4. Diyabetik Kardiyomiyositlerde Redoks Durumu (Thiol oksidasyonu) 57

4. TARTIŞMA 58

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 66

ÖZET 68

SUMMARY 69

KAYNAKLAR 70

ÖZGEÇMİŞ 91

ÖNSÖZ

Doktora çalışmalarım süresince verdiği destek ve sağladığı olanaklar için Prof. Dr. Belma TURAN'a, ve çalışmalarımda maddi/manevi katkısı olan tüm dostlarıma teşekkür ederim.

Hücre içi lokal Ca^{2+} salınım kayıtları ve analizi süresince yardımlarını esirgemeyen Allain LACAMPAGNE'e, çalışmamın her aşamasında katkılarından dolayı Prof. Dr. Mehmet UĞUR'a ve çalışmanın gerçekleşebilmesi için olanaklarını ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Nuhan PURALI, Prof. Dr. Hakan GÜRDAL teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım sırasında emekleri ve mesaileri ile her zaman yanımda olan Biyofizik ABD çalışanlarına ayrıca teşekkür ederim.

Her zaman, destekleri, koşulsuz sevgileri ve varlıklarıyla bana güç veren sevgili Eşim ve Aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

$[Ca^{2+}]_i$	Hücre içi serbest Ca^{2+} derişimi
ACE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
Ang II	Anjiyotensin II
AP	Aksiyon potansiyeli
AT_1	Anjiyotensin II'nin tip 1 reseptörü
AT_2	Anjiyotensin II'nin tip 2 reseptörü
CaM	Calmodulin
CICR	Ca^{2+} uyarımlı Ca^{2+} salımı
DAG	Diaçilgliserol
DM	Diabetes mellitus
DT_{50}	Maksimum değerin % 50'sine iniş süresi.
FKBP12.6	FK506 bağlayan protein (calstabin2)
IDDM	İnsüline bağlı diabetes mellitus
LTCC	L tipi kalsiyum kanalı
NCX	Na^+/Ca^{2+} değiştokuşçusu
NIDDM	İnsülinden bağlı olmayan diabetes mellitus
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PLB	Fosfolamban
PLC	Fosfolipaz C
PP1	Phosphatase 1
PP2A	Phosphatase 2A
RAS	Renin-anjiyotensin sistemi
RYR	Ryanodine Reseptörü
SERCA	Sarko/endoplazmik retikulum ATPaz
SR	Sarkoplazmik retikulum
STZ	Streptozotocin
TP	Tepe değerine ulaşma süresi.
β-AR	Beta adrenoseptör

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Ventrikül aksiyon potansiyelinin evreleri ve onlara karşılık gelen iyon akımları. 2

Şekil 1.2. Kardiyomiyositlerde hücre içi Ca düzenleme mekanizması. Grafik aksiyon potansiyeli, Ca tranzienti ve kasılmanın zamansal değişimlerini göstermektedir. NCX, Na^+/Ca^{2+} değiştokuşu; ATP, ATPaz; PLB, fosfolamban; SR, sarkoplazmik retikulum (Bers, 2002). 4

Şekil 1.3. RYR2 makromoleküler kompleksin şematik gösterimi. Calmodulin (CaM), FKBP12.6 (calstabin2), protein kinase A (PKA), phosphatase 1 (PP1) ve phosphatase 2A (PP2A) RYR'nun sitoplazmik bölgesine bağlanırlar. Junctin and triadin, SR Ca^{2+} konsantrasyonuna bağlı olarak calsequestrin'i RyR'ye SR'ın intraluminal kısmına bağlarlar (Yano ve ark, 2005) 6

Şekil 1.4. Kardiyak hücrelerde anjiyotensinin sinyal iletim mekanizması. PLC, fosfolipaz C; IP_3, inositol trifosfat; DAG, diaçil gliserol; PKC, protein kinaz C; MAPK, mitojenle-aktiflenen protein kinaz; PTKs, protein tirozin kinazlar; MKP-1, MAPK fosfataz-1; PTPaz, protein tirozin fosfataz; PP2A, serin/treonin fosfataz 2A; SH-PTP, Src homolojik yapısı içeren tirozin fosfataz; NO, nitrik oksid; JAK2, janus kinaz-2 (Dostal, 2000)..... 18

Şekil 1.5. Diyabetik kardiyomiyopati gelişimi sırasında oksidatif stresin neden olduğu kalp yetmezliği için önerilen mekanizma (Dhalla ve ark, 1998). 20

Şekil 2.1. Kardiyak hücrelerden Ca^{2+} spark kayıt ve analiz için oluşturulan grafikler. Fluo-3 ile yüklenmiş bir kardiyomiyositin konfokal miksoskop ile alınan flurasan ve gerçek görüntüsü en üstte görülmektedir. Hücre üzerinde boyuna tanımlanan doğrunun zaman içinde değişimi ortadaki grafiği oluşturmaktadır. 4–5 piksel genişliğinde zamansal (mavi eğri) ve uzaysal ortalama eğrisi ile (kırmızı eğri) spark parametreleri hesaplanmıştır. 28

Şekil 2.2. Kardiyak hücrelerden kaydedilen bir Ca^{2+} spark üzerinde ölçülen parametreler. En yüksek $\Delta F/F$ değeri genlik, bazal seviyeden tepe değerine ulaşma süresi, TP; Tepe değerinin %50'sine düşmesi için geçen süre, DT_{50}; Tepe değerin yarısında oluşan kalınlık FWHM ile gösterilmektedir. 29

Şekil 3.1. L-tipi kalsiyum kanal akımları. *Solda*, K ve DM gruplarına ait örnek I_{CaL} kayıtları (0 mV); *Sağda,* 0 mV'da ölçülen akım yoğunlukları ortalamasından elde

edilen değerleri gösteren grafik. Değerler ortalama ± standart hata ile temsil edilmiştir. 35

Şekil 3.2. Değişmiş diyabetik sıçan kardiyomiyositleri Ca^{2+} transientleri ve bazal $[Ca^{2+}]_i$. A; Kontrol ve Diyabetik hücrelerin örnek transientleri ve B; transientlerden hesaplanan ortalama değerler (ortalama±SEM). C; Grupların bazal $[Ca^{2+}]_i$. *p<0,01 vs K grubu. 37

Şekil 3.3. Diyabetik durumda Ca^{2+} sparklarının uzaysal ve zamansal özellikleri. A; İzole kardiyomiyositlerin doğru-tarama modunda elde edilen örnek görüntüleri. B; Görüntülerden elde edilen sparkların zamansal ve uzaysal profilleri. C; Kontrol ve Diyabetik gruplarda ölçülen sparkların TP, DT_{50} ve Mak ortalama değerleri (ortalama±SEM). D; İki grup için elde edilen sparkların genişlik (FWHM) ve frekans değerleri. *p<0,01 vs K grubu. 38

Şekil 3.4. Diyabetin Ca^{2+} spark parametrelerine etkisi. A; Kontrol ve Diyabetik gruplarda ölçülen sparkların TP, DT_{50} ve Mak ortalama değerleri (ortalama±SEM). B; İki grup için elde edilen sparkların genişlik (FWHM) ve frekans değerleri. *p<0,01 vs K grubu. 39

Şekil 3.5. RYR2 protein seviyeleri ve fosforilizasyon durumu. A; Kontrol ve diyabetik sıçanlar için RYR2, RYR2-P ve FKBP12.6 örnek western blot resimleri. B; Gruplar arasında gözlenen RYR2 ve FKBP12.6 ortalama değişimleri gösteren grafikler. *p<0,01 vs K grubu. 41

Şekil 3.6. Kardiyak hücrelerden kaydedilen örnek Ca^{2+} spark görüntüleri. Kontrol (K), diyabet (DM),candesartan (1 μM) ve BIM (10 μM) ile inkübe edilen K ve DM grubu hücreleri (sırasıyla K+Can, K+BIM, DM+Can ve DM+BIM) için örnek ΔF/F resimleri (sol kolon) ve zaman profilleri(sağ kolon)..... 44

Şekil 3.7. Grupların lokal Ca^{2+} salınımı parametreleri. Kontrol (K), diyabet (DM) ve 10 μM candesartan ile 6-8 saat inkübe edilen diyabet (DM+Can) ve kontrol (K+Can) ve 100 nM BIM ile inkübe edilen kontrol (K+BIM) ve diyabet (DM+BIM) grupları için tepeye çıkış süresi (A), tepenin %50'sine düşüş süresi (B), maksimum genlik(C), maksimum genliğin yarısında oluşan genişlik (D), frekans (E) ortalama değerler için çizdirilmiş histogramlar. Değerler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. *p<0,01 vs K grubu, †p<0,01 vs DM grubu. 45

Şekil 3.8. L-tipi kalsiyum kanal akım yoğunlukları. Zar potansiyeline göre ölçülen akım yoğunluklarının ortalamasından elde edilen değerlerin değişimini gösteren grafik ve akımın kayıt protokolü. Değerler ortalama ± SEM ile temsil edilmiştir. ... 47

Şekil 3.9. Voltaj kenetlemesi ile uyarılarak kaydedilmiş Ca^{2+} transientleri. A; 0 mV'a kenetlenen hücrelerde oluşan transient örnekleri., B; 0 mV'a kenetlenen hücrelerde oluşan transient ortalama değerleri. *p<0,01 vs K grubu, p<0,01 vs DM grubu..... 49

Şekil 3.10. Grupların hücre içi serbest bazal Ca^{2+} seviyeleri. Dinlenim durumundaki kardiyomiyositlerinden kaydedilen sinyallerin ortalama değerleri ve standart hatalar (ortalama±SEM). *p<0,01 vs K grubu, †p<0,01 vs DM grubu..... 50

Şekil 3.11. Candesartan ve BIM inkubasyonunun diyabetik sıçan kalbi RYR2 üzerine etkisi. Gruplar için örnek western blot örnek resimleri ve ortalama değerlerin bar grafik gösterimleri. *p<0,01 vs K grubu, †p<0,01 vs DM grubu..... 52

Şekil 3.12. Diyabetik sıçan kalbi RYR2 fosforilasyonu üzerine Candesartan ve BIM inkubasyonunun etkileri. Gruplar için örnek western blot örnek resimleri (A) ve ortalama±standart hata değerlerin bar grafik gösterimleri (B). Kontrol hayvanları kardiyomiyositlerinde RYR-P2809 antikorlarına karşı görüntü oluşmadığı için değerler hesaplanamamıştır. †p<0,01 vs DM grubu..... 53

Şekil 3.13. Diyabetik sıçan kardiyomiyositlerinde Can ve BIM inkubasyonunun FKBP12.6 düzeyine etkisi. Gruplar için örnek western blot örnek resimleri (A) ve tüm deney grupları için ortalama±standart hata değerlerin bar grafik gösterimleri (B). *p<0,01 vs K grubu, †p<0,01 vs DM grubu..... 54

Şekil 3.14. Normal ve Diyabetik sıçan kalp hücrelerinde Can ve BIM inkubasyonunun PKC içeriğine etkisi. Tüm grupların hücrezarı (A) ve sitozolik (B) kısımlardan elde edilen PKC içeriği ve hücrezarı/sitozolik oranı (C). Her grup için sayılaştırılan bant örnekleri grafiklerin üstlerinde gösterilmiştir. *p<0,01 vs K grubu, †p<0,01 vs DM grubu. 56

Şekil 4.1. Diyabetik durumda Ca^{2+} dalgasının zamansal özelliği. Aynı zaman eksenine sahip kontrol (K) ve diyabetli (DM) sıçan kardiyomiyositlerinde gözlenen Ca^{2+} dalgasının karşılaştırılması. 60

ÇİZELGELER

Tablo 3.1: Hayvanların genel parametreleri..... 34

Tablo 3.2: Normal ve Diabetik sıçan kalpleriden elde edilen izole kardiyo-miyositlerin sulfhydryl içeriği üzerine Candesartan ve BIM etkisi. 57

1. GİRİŞ

1.1. Kalbin Genel Özellikleri

Vücudun tüm doku ve organlarına kan pompalayan kalp, fibröz bir kılıf olan perikardiyum ile sarmalanmış kas yapısında bir organdır. Miyokardiyum da denilen kalbin duvarları temel olarak kardiyak kas hücrelerinden oluşur. Kalbin dış yüzü epikardiyum ile atrium ve ventrikül kavitelerinin iç yüzleri ise, bağ dokusundan oluşan endokardiyum ile kaplıdır. Endokardiyumun altında kollajen yapı, elastik lifler ve rudimenter düz kas tabakası bulunur. Kalbin esas kalınlığını oluşturan kas tabakası ise, endokardiyum ile epikardiyum arasındaki miyokardiyumdur (Katz, 1991; s.:1-73). Miyokardiyumun kalp-kası hücreleri birbirine sıkıca bağlanmış tabakalar halinde düzenlenmiş olup, kanın bulunduğu odacıkları bütünüyle sarar. Bir odacığın duvarları kasıldığında sıkılmış bir yumruk gibi bir araya gelir ve çevreledikleri kana basınç uygularlar. Komşu hücreler interkale diskler denen yapılar aracılığı ile uc uca eklenirler. Bunların içinde hücreleri bir arada tutan ve miyofibrillerin de bağlandığı desmozomlar vardır (Vander ve ark., 1994; s.: 410).

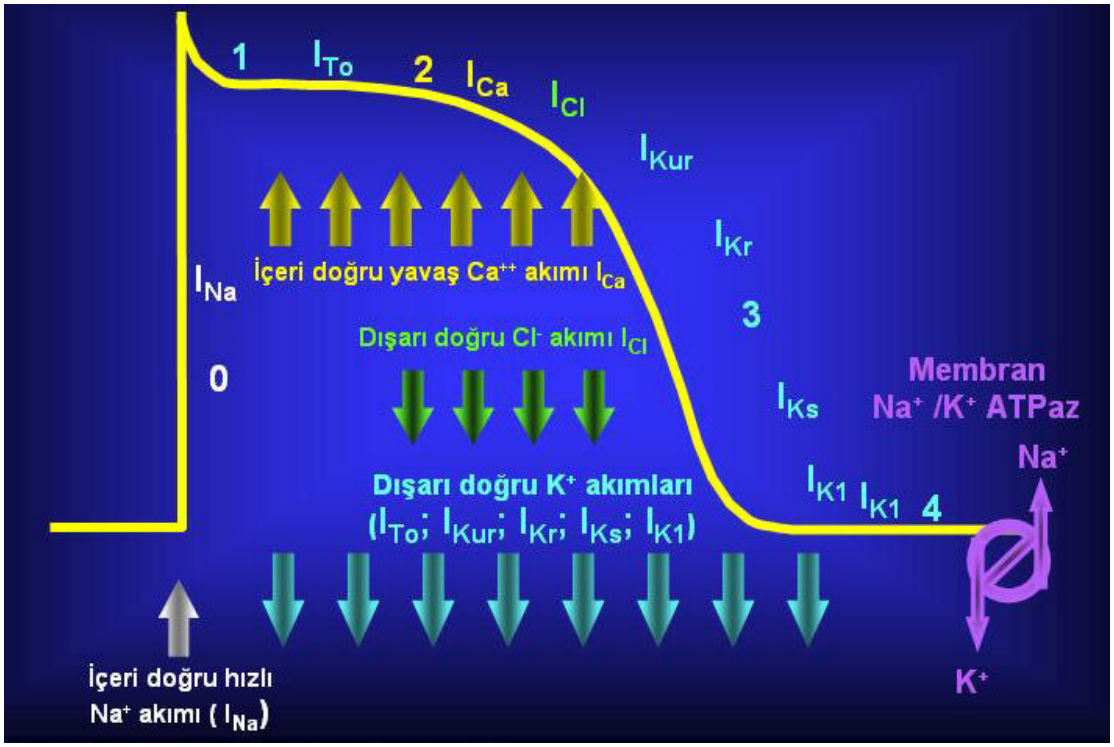
Kalbi uyaracak sinyallerin başlaması ve yayılması için kalbin doğrudan bağlantılı olduğu bir sinir sistemine ihtiyaç yoktur. Kalpte uyarı bir noktadan başlayarak kalbin kendi iletim sistemi aracılığı ile tüm kalbe yayılır. Uyarının iletimi oyuk-kavşak (gap junction) denilen hücreler arası bağlantılar yoluyla gerçekleşir.

1.2. Kardiyomiyositlerde Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi

Kardiyomiyositleri saran hücre zarı (sarkolema) depolarizasyonuyla başlayan ve kalbin kasılmasına kadar süren olaylar zincirine uyarılma-kasılma çiftlenimi (excitation-contraction coupling) adı verilir. Kalp kasının kasılması diğer kaslarda da olduğu gibi kası oluşturan hücrelerin zarlarının depolarizasyonu ile tetiklenir. Hücrelerin birbiriyle bağlantılı (gap junction aracılığı ile) olmalarından dolayı oluşan

aksiyon potansiyeli (AP) bir hücreden diğerine geçer. Böylece, başlangıçta bir hücrenin uyarılması diğer bütün hücrelerin uyarılmasıyla sonuçlanır (Wahler, 1997).

AP oluşmasının altında zar geçirgenliklerindeki değişimler yatmaktadır. Dinlenim durumunda hücre zarı potasyum iyonlarına (K^+) daha geçirgen olduğu için dinlenim zar potansiyeli K^+ denge potansiyeline (Nerst Potansiyeli) yakın bir değerdedir (Wahler, 1997).



Şekil 1.1. Ventrikül aksiyon potansiyelinin evreleri ve onlara karşılık gelen iyon akımları.

Kalbin AP'nin konfigürasyonu çeşitli fazlara bölünebilir. Şekil 1.1'de ventrikül hücresi AP'nin 5 fazı ve temel olarak her fazdan sorumlu olan akımlar görülmektedir. Faz 0 AP'nin sıçraması; faz 1 erken repolarizasyon evresi; faz 2 plato evresi; faz 3 asıl repolarizasyon fazı ve faz 4 dinlenim potansiyeli evresidir. AP'nin sodyum iyon (Na^+) akımlarına bağlı olan hızlı sıçrama faz 0 evresidir. Bu akımın hızlı aktivasyon ve inaktivasyon kinetikleri vardır. 1 ms'de tepe değerine ulaştıktan sonra kendiliğinden azalır (inaktivasyon). Ufak bir depolarizasyonla Na^+ kanalları açılmaya başladığında, elektrokimyasal gradyentten dolayı Na^+ hücre içine girmeye başlar. Bu durum hücrenin daha fazla depolarize olmasına ve depolarize oldukça da

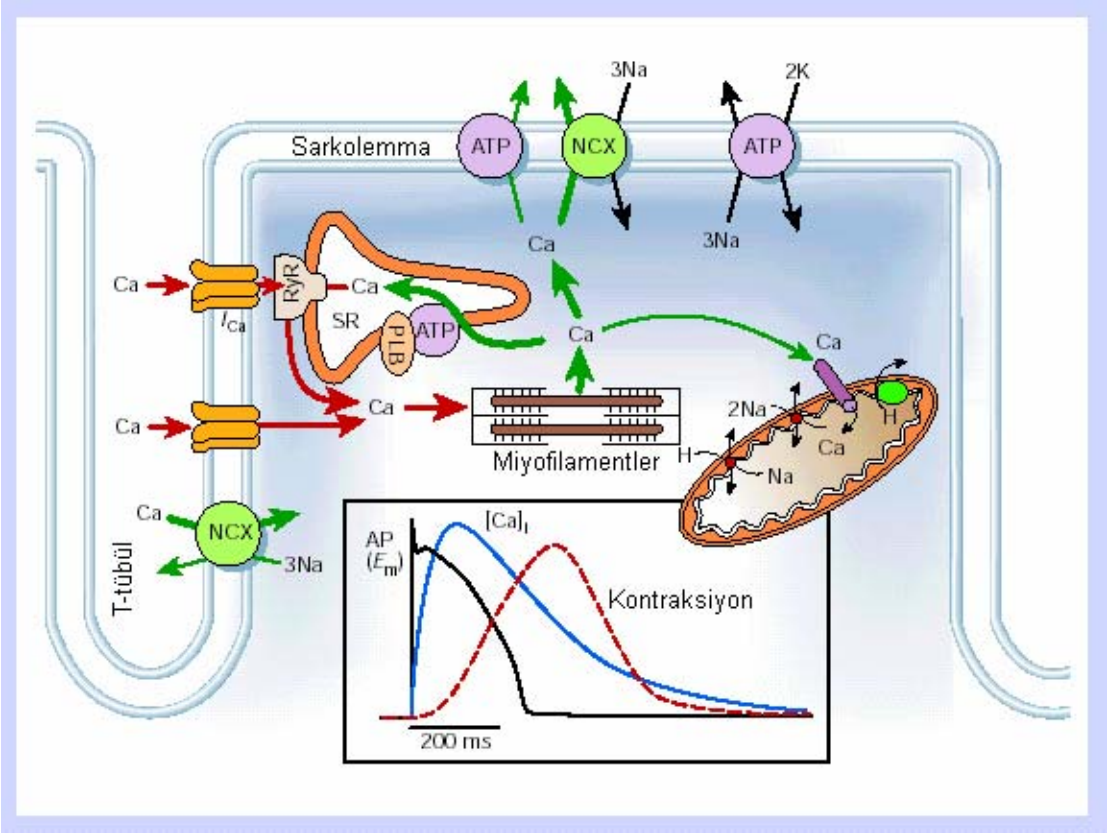
yeni Na^+ kanallarının açılmasına neden olur. AP'nin çıkışını hemen takip eden geçici ve bağıl olarak küçük repolarizasyon faz 1 evresidir. Büyük oranda depolarizasyonla hızla açılan bir tip K^+ kanalının geçici dışarı doğru (transient outward (I_{to})) akımına bağlıdır. Daha az olmakla birlikte klor iyon (Cl^-) akımının da katkısı vardır. Plato evresi olarak bilinen bu faz erken repolarizasyon fazını takip eden ve zar potansiyelinin görece sabit olduğu süreci faz 2 evresini kapsar. Kalp kası hücrelerinde görülen uzun AP'nin nedenidir. Platonun nedeni içeri doğru pozitif akımların dışarı doru pozitik akımları neredeyse dengelemesidir. L-tipi Ca^{2+} kanallarından içeri doğru Ca^{2+} girişine karşılık, yavaş aktive olan K^+ (gecikmiş doğrultucu akım (I_K)) kanallarından K^+ dışarı çıkar. Buna ek olarak, I_{to}'da platonun erken evresine katkıda bulunmaktadır. Platoyu takip eden son repolarizasyon faz 3 evresidir. İnaktivasyon nedeniyle I_{Ca} zamanla azalırken, yavaş aktive olan I_K artar ve baskın hale gelir. Bu akımın inaktivasyonu olmadığından uzun sürelidir. Ventrikül hücrelerinde 4. faz dinlenim potansiyelidir. Zar K^+ iyonlarına yüksek geçirgenlik gösterdiğinden K^+ denge potansiyeline yakın bir değer almaktadır. Dinlenim potansiyeli büyük oranda içeri doğrultucu da denen bir tip K^+ akımı (I_{K1}) tarafından belirlenmektedir.

Ayrıca, AP'ye katkıda bulunan pompalar da bulunmaktadır: Küçük bir akım oluşturmakla birlikte elektrojenik olan Na^+/K^+ pompasının asıl işlevi akım üretmekten çok AP'yi oluşturacak iyonik gradyentleri korumaktır (Wahler, 1997). Diğer yandan, hücre zarında bulunan ve yine elektrojenik olarak çalışan ve sadece bir cins iyonun gradyentini kullanarak diğer iyonu yokuş yukarı taşıyan Na^+/Ca^{2+}-değiştokuşçusu (NCX) normal modunda dışarı attığı her Ca^{2+} için içeri 3 Na^+ taşırken, plato evresinin başlangıcında ters yönde çalışarak önemli bir Ca^{2+} akım oluşturmaktadır. Bu yüzden, NCX'in AP'nin şekline de etkisi olduğu ileri sürülmüştür (Janvier ve Boyett, 1996) .

1.3. Ca^{2+} Uyarımlı Ca^{2+} Salınımı

Kardiyak hücre membranının depolarizasyonu sonucu açılan L-tipi Ca^{2+} kanallarının aracılığıyla hücre içine Ca^{2+} girişi ile başlar (Şekil 1.2). Küçük miktardaki bu Ca^{2+}

akışı sarkoplazmik retikulum (SR) yüzeyindeki riyanodin reseptörlerinden (RYR) çok daha büyük bir Ca^{2+} salımına yol açar. Sarkoplazmik retikulum aktivasyonunun ve Ca^{2+} salımının ardından, depolarizasyondan sonraki 20-40 ms'lik süreçte hücre içinde serbest Ca^{2+} konsantrasyonunda ($[Ca^{2+}]_i$) 100 nM olan diastolik seviyeden, 1 μM'lık sistolik seviyeye ani bir artış gerçekleşir (Bracken ve ark., 2003). Genellikle, SR'dan Ca^{2+} salımının temel mekanizması kabul edilen bu olaya "Ca^{2+}–uyarımlı Ca^{2+}–salımı" (CICR) denir (Bers, 2002; Bracken ve ark., 2003).



Şekil 1.2. Kardiyomiyositlerde hücre içi Ca düzenleme mekanizması. Grafik aksiyon potansiyeli, Ca tranzienti ve kasılmanın zamansal değişimlerini göstermektedir. NCX, Na^+/Ca^{2+} değiştokuşu; ATP, ATPaz; PLB, fosfolamban; SR, sarkoplazmik retikulum (Bers, 2002).

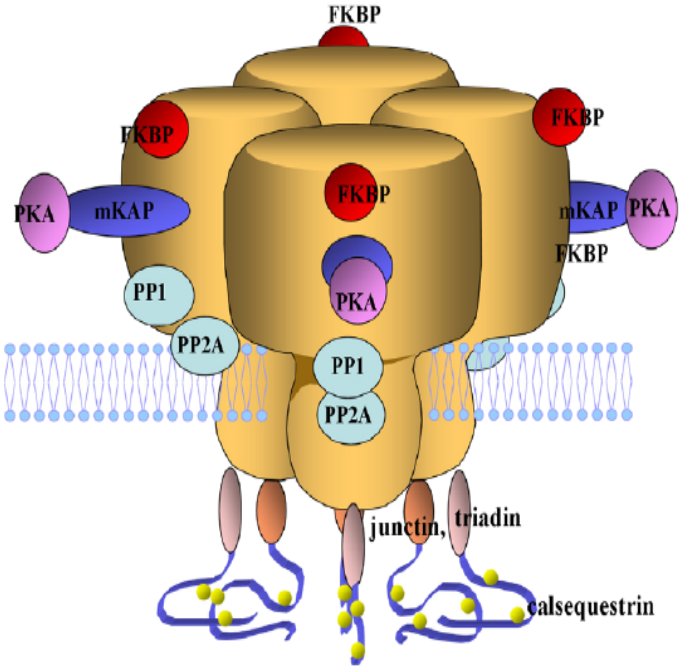
Kasılma işi, Ca^{2+}'un troponin C miyofilamentine bağlanıp kontraktil makine adı verilen aktin-miyozin-tropomiyozin kompleksini harekete geçirmesiyle başlar. Kısaca, troponin C-Ca^{2+} kompleksi tropomiyozin ile etkileşerek aktin ve miyozin miyofilamentleri arasındaki aktif bölgelerin açığa çıkmasını ve çapraz köprülerin

oluşmasını sağlar. Böylece, sarkomer boyu kısalır ve kasılma gerçekleşir (Bers, 2002; Bracken ve ark., 2003).

Ca^{2+}'un SR Ca^{2+} –pompası (SERCA) ile SR içine geri alınması, Ca^{2+} pompası ve NCX ile hücre dışına atılmasıyla hücrede $[Ca^{2+}]_i$ dinlenim seviyesine düşer (Wahler, 1997; Bers, 2002; Bracken ve ark., 2003). Bu sırada Ca^{2+} troponin C'den ayrılır (kasın gevşeme süreci) ve kas başlangıçtaki dinlenim durumuna geri döner (Bers, 2002; Bracken ve ark., 2003).

1.3.1 Sarkoplazmik Retikulum ve Ryanodine Reseptörleri

Kasılma mekanizmasında yeterli $[Ca^{2+}]_i$ yükselişi, SR'u gelişmiş kalp hücrelerinde SR'dan salınan Ca^{2+} ile başarılmaktadır. Ayrıca, kasılma sonunda yükselmiş olan $[Ca^{2+}]_i$, yine SR tarafından geri alınarak (reuptake) ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Kısaca SR, $[Ca^{2+}]_i$ regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Endoplazmik retikulumun oldukça özelleşmiş formu olan sarkoplazmik retikulum, 20-60 nm çapındaki tüplerin birbirine bağlanmasıyla oluşan, miyofibrilleri saran, intrasellüler bir ağdan oluşur (Severs, 1990; Van Winkle ve ark., 1988). Kalp kasında SR, sarkomerin M-bandının üzerinde kavşaklar ve çıkıntılar oluşturarak bölümlere ayrılmıştır. SR ağı, sarkolemmanın T-tübüler yapısına çıkıntıları ile yaklaşan ve yer yer kavşaklar yapan terminal sisterna (junctional SR - jSR*)* ve miyofibrillere yaklaşan, ancak dış sarkolemma ile fiziksel bağlantısı bulunmayan longitudinal SR (lSR) (Van Winkle ve ark., 1988) olarak iki ana yapıdadır. Kardiyak terminal sistemalar (jSR), iskelet kası SR'undan farklı olarak, T-tübülüs sistemini sararlar (Forbes, 1982). Bu genişleyerek kavşak yapan sisternal yapının Ca^{2+} depolan olduğu kabul edilmektedir. T-tübülüs sistem ile sistemler arasındaki köprüleşmelere ise ayaklaşma denir ve Ca^{2+} salınım kanalları burada bulunmaktadır (Lai ve ark, 1988a:1988b; Meissner, 1975). SR yapısı ise, miyofibrillerin arasına yoğun bir şekilde yayılmış olup, Ca^{2+}'un geri alınımından (reuptake) sorumludurlar (Carafoli ve ark, 1989; Entman ve ark, 1986).



Şekil 1.3. RYR2 makromoleküler kompleksin şematik gösterimi. Calmodulin (CaM), FKBP12.6 (calstabin2), protein kinase A (PKA), phosphatase 1 (PP1) ve phosphatase 2A (PP2A) RYR'nun sitoplazmik bölgesine bağlanırlar. Junctin and triadin, SR Ca^{2+} konsantrasyonuna bağlı olarak calsequestrin'i RyR'ye SR'ın intraluminal kısmına bağlarlar (Yano ve ark, 2005)

RYR'ler literatürde bilinen en büyük iyon kanallarıdır (Şekil1.3). Her monomer yaklaşık 5000 amino asitden oluşur ve 565 kDa moleküler ağırlığına sahiptir. RYR ler 3 izoformu bilinmektedir. RYR1 baskın olarak iskelet kasında bulunmaktadır (Marks, 2001; Takeshima ve ark, 1989), RYR2 izoformu ise kalp kası izoformu olarak bilinmektedir (Nakai ve ark, 1990; Otsu ve ark, 1990). RYR3 ilk olarak tavşan beyninde gözlenmiştir (Hakamata ve ark. 1992). Kalp kası RYR izoformları, RYR1 den farklı olarak L tipi Ca^{2+} kanalları (LTCC) ile fiziksel bir bağlantısının olmadığı düşünülmektedir. Sayıları 50-100 civarında olan RYR2, SR üzerinde belirli bölgelere birbirleriyle fonksiyonel olarak eşleşmiş ve senkronize çalışacak şekilde yerleşmişlerdir. Kardiyomiyositlerde, AP sırasında açılan LTCC aracılığıyla hücre içine giren küçük miktar Ca^{2+} RYR2 aktivasyonuna neden olur (Bers 2002). L tipi Ca^{2+} kanalları akımı ile tetiklenen SR dan Ca^{2+} salınım miktarı uyarılma-kasılma çiftlenimi kazancı olarak nitelendirilir (Wier ve ark, 1994). Kalp yetmezliği modeli ile yapılan çalışmalarda bu kazancın azaldığı ve bunun nedeni olarak LTCC lerde oluşan fonksiyonel bozuklukların (Barrere-Lemaire ve ark, 2000; He ve ark, 2001;

Piot ve ark, 1996), LTCC ve RYR ler arasındaki mesafenin artması (Gomez ve ark, 1997), SR Ca^{2+} içeriğinin azalması (Hobai ve O'Rourke, 2001; Lindner ve ark, 1998; O'Ruorke ve ark, 1999) ve/veya RYR kanal açılma özelliklerindeki bozulması (Blinks ve Hannon 1996; Litwin ve ark 2000; Sah ve ark 2002; Yamamoto ve ark. 1999) gösterilmiştir.

Çeşitli tipte ve sayıda düzenleyici proteinler RYR2'ye bağlanarak daha büyük bir makromoleküler yapı oluşturmaktadırlar. Bu proteinlere, kalmodulin (CaM), FK506 bağlayan protein (FKBP12.6), Protein Kinase A (PKA), fosfotaz 1 (PP1), fosfotaz 2A (PP2A) örnek olarak verilebilir. Bunların çoğunluğu RYR2 lerin sitoplazmik bölümüne bağlanmaktadırlar (Marks ve ark 2002a; 2002b). Marks ve ark tarafından yapılan çalışmalarda RYR2 nin PKA ile fosforilasyonu sonucu FKBP12.6'nın kanal oluşturan kompleksten ayrılmasını sağladığı ve bunun sonucunda kanalın açılma olasılığının arttığını ileri sürmektedirler (Derleme için Wehrens ve Marks 2003'e bakınız).

1.4. *Diabetes Mellitus*

Diabetes Mellitus, pankreastan insülin salgılanmasının mutlak ya da kısmieksikliği ya da insülin etkisinin yetersizliği sonucu oluşan bir sendromdur. Bu sendrom; esas olarak hiperglisemi ve glikozüri, ayrıca karbohidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluklara bağlı olarak polifaji, polidipsi, poliüri ve ketozis gibi belirtilerle karakterize edilmektedir. Diyabet hastalık tablosunun sıklıkla görülen diğer bulguları ise hiperglisemi sonucu glikozillenmiş hemoglobin düzeylerinde yükselme, mikroanjiyopati, makroanjiyopati ve nöropatidir (Larner, 1985).

Amerikan Diyabet Derneği (ADA), *Diabetes Mellitus*'u IDDM veya Tip 1 (İnsüline bağlı diyabet, juvenil tip diyabet) ve NIDDM veya Tip 2 (İnsüline bağlı olmayan diyabet, erişkin tipi diyabet) olarak 2 sınıfa ayırmaktadır. IDDM Tip 1, NIDDM ise Tip 2 diyabet olarak bilinmektedir (Nolte ve Karam, 2001). Tip 1 Diyabet pankreasın beta hücrelerinin çeşitli etkenler sonucu tahrip olmasından kaynaklanırken (Madsbad,1983), Tip 2 diyabette asıl sorun hedef hücrelerde insülin etkilerine karşı

rezistans oluşumudur. Amerika'da 14 milyon kadar diyabetli hasta olduğu ve bunların en az 1.5 milyonunun Tip 1 diyabetli olduğu saptanmıştır (Nolte ve Karam, 2001).

Tip 1 diyabette hücre hasarına neden olan etkenler tam olarak bilinmemekle beraber, bu hasarın virüslere ve otoimmuniteye bağlı olduğuna ilişkin veriler bulunmaktadır (Maclaren,1977; Yoon ve ark.,1979; Yoon ve ark.,1983). Buna ek olarak, kimyasal yapısı farklı olan ve düşük biyolojik aktivite gösteren insülin salgılanması da bu tip diyabetin oluşumuna aracılık etmektedir (Elliot ve ark.,1965 : Haneda, 1984).

Juvenil tip diyabet 20 yaşına kadar olan bireylerde yani gençlerde görülmekle beraber yaşlılarda da nadiren ortaya çıkmaktadır. Tip 1 diyabet kanda insulinin bulunmadığı, plazma glukagonunun arttığı ve pankreatik beta hücrelerinin ınsulinojenik uyarıların tümüne cevap veremediği katabolik bir bozukluktur.

Tip 2 diyabet genellikle yetişkinlerde ve nadiren gençlerde görülen, diyabetin daha ılımlı bir şeklidir. Dolaşımdaki insülin düzeyi çoğunlukla normal olmasına karşın, hedef dokuların duyarsızlığından dolayı göreceli olarak yetersizdir. Obezite, insülin etkilerinin hasarına yol açtığı için Tip 2 diyabette genel bir risk faktörüdür (Nolte ve Karam, 2001). Tip 2 diyabetin oluşum nedenleri şöyle sıralanabilir; a) Beta hücreleri üzerindeki glukoreseptörlerde meydana gelen bir bozukluk sonucu glukoz aracılığıyla bu reseptörlerin uyarılmasına bağlı olarak oluşan insülin salgılanmasının azalması (De Fronzo ve Ferrannini,1982); b) Beta hücresine giren glukozun orada öteki stimulanların insülin salıverici etkilerini güçlendirme yeteneğinin azalması (Champbell,1984); c) İnsülin reseptörlerinin sayısının azalması (Weir,1982); d) Anti insuliner sistemin egemen duruma geçmesi. Yapılan istatistikler Tip 2 diyabetin genellikle obezite ve kalıtımla ilgili olduğunu ortaya koymuştur (Porte ve ark.,1981).

1.4.1 Deneysel Diyabet

Diabetes Mellitus'taki en önemli hormonal bozukluğun mutlak ya da kısmi insulin eksikliği olduğunun anlaşılması deneysel diyabet oluşturulmasında temel teşkil etmiştir. Deneysel diyabet, pankreotektomi ya da pankreasın beta hücrelerinin kimyasal maddelerle tahrip edilmesiyle oluşturulmaktadır.

Kalıcı bir diyabet oluşturmak için hemen hemen tüm hayvanlarda pankreasın yaklaşık %80'den fazlasını almak gerekmektedir (Lukens, 1938). Bunun sonucunda özellikle yüksek karbonhidrat diyeti ile beslenen türlerin geriye kalan pankreasında daha belirgin olmak üzere aktivite azalmakta ve beta hücrelerinde dejeneratif değişiklikler oluşmaktadır. Buna ek olarak hayvanlarda deneysel diyabet oluşturmak için kimyasal maddelerden de yararlanılmaktadır. Bunlardan en çok kullanılanlar alloksan ve streptozotosindir.

Dunn ve arkadaşları 1943 yılında (Dunn ve McLetchie,1943) alloksanın sıçanlarda pankreasın beta hücrelerini tahrip etmek suretiyle kalıcı bir diyabet oluşturduğunu göstermişlerdir. Alloksanın sulu çözeltisi intravenöz ya da intraperitonel olarak sıçan dışındaki diğer hayvanlarda da diyabet oluşturmaktadır (Bailey, 1943; Duff, 1945).

Rakieten ve arkadaşları (Rakieten ve ark., 1963) 50 mg/kg streptozotosinin intravenöz uygulamasının sıçan ve köpeklerde kalıcı bir diyabet oluşturduğunu saptamışlardır. Bu maddenin diyabetojenik etkisi, alloksan gibi pankreasın beta hücrelerinde selektif olarak tahribat meydana getirmesinden kaynaklanmaktadır STZ alloksana göre beta hücresi dışındaki yapılara daha az zarar verdiği için diyabet oluşturmak amacıyla daha yaygın kullanılmaktadır (Arison ve ark., 1967).

1.5. Diyabetik Kardiyomiyopati

Kardiyomiyopati görünür koroner hastalığı olmadan gelişen genel bir diyabet komplikasyonudur (Rubler ve ark,1972; Fein ve ark, 1980; Galderisi ve ark, 1991;

Penpargkul ve ark, 1980). Diyabetik kardiyomiyopati gelişimi birçok etkene bağlı olmasına karşın diyabetik kalpte hücreiçi $[Ca^{2+}]_i$ homeostazına bağlı mekanik fonksiyonun bozulduğuna dair kanıtlar fazlasıyla mevcuttur (Pierce ve Russell, 1997; Choi ve ark, 2002; Özdemir ve ark, 2004)

Diabetes Mellitus, bugün, dünyada 125 milyondan fazla insanda görülen bir sağlık problemidir. Bu sayının 2010 yılında 220 milyona ulaşacağı düşünülmektedir (Amos ve ark., 1997). Diyabet görülme sıklığının en yüksek olduğu yerler; Kuzey Avrupa (Finlandiya, v.s.), en düşük olduğu yerler ise Güney Avrupa ülkeleridir (Fransa, İtalya, v.s.) (Davis ve Granner, 2001). Amerika'da 1981'den bu yana 1 milyondan fazla diyabetik hasta, bu bireylerde majör morbidite ve mortalite nedeni olan kardiyovasküler hastalık nedeniyle tedavi görmektedir ve bu kişiler arasındaki ölüm oranı %10'dur (WetterfalI ve ark., 1992).

Kardiyovasküler hastalıklar diyabette gözlenen mortalite ve morbiditenin en önemli nedenidir. Bu komplikasyonlar, hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabette ateroskleroz oluşumunu hızlandırmakta ve miyokardiyal infarktüs, inme (stroke) ve gangren gibi ölümcül komplikasyonlarla sonuçlanmaktadır. NIDDM'li bireyler non-diyabetiklere oranla 3-4 kat daha fazla kardiyovasküler ölüm riski taşımaktadır. Diyabetle kardiyak hastalık arasındaki ilişkiyi açıklamak için çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır. Hipertansiyon, lipid metabolizmasındaki değişimler, hipoinsulinemi ve böbrek fonksiyonu bozukluğu bunlara örnek olarak verilebilir (Krankenhaus, München-Schvvabing, 1990).

Diyabetin yol açtığı kardiyovasküler bozukluklar; koroner ve serebral arter hastalığına yol açan hızlanmış ateroskleroz, sistemik hipertansiyon, kardiyomiyopati, mikrosirküler bozukluk ve otonomik fonsiyon bozukluğu olarak sıralanabilir (Borczuk ve Factor, 1996).

Sıçanlarda diyabetle birlikte hipertansiyon görülmesinin konjestif kalp yetmezliğine yol açtığı ortaya konmuştur (Factor ve ark., 1980). Diyabetin iskemik kalp hastalığı için de bir risk faktörü olduğu iyi bilinmektedir, fakat bunun diyabete bağlı

mikroanjiyopati sonucu mu yoksa insulin eksikliği ile ilgili farklı bazı patolojik defektlerle mi ilgili olduğu çok kesin değildir (Dhalla ve ark,1985).

Diyabette kalp fonksiyonlarında birçok değişim görülmektedir. Diyabetik sıçan modelinde STZ uygulanmasından 4-8 hafta sonra miyokart fonksiyonunun bozulduğu belirtilmiştir (Dai ve ark., 1994). İzole sıçan kalbinde NE (Norepinefrin)'ne, Ca^{2+}'a ve spontan taşikardiye karşı koroner vazodilatör yanıtlar bozulmuştur (Koltai ve ark., 1983). Nitenberg ve ark. (1993), diyabetik hastalarda maksimum koroner kan akım rezervinde azalma ve endotel bağımlı epikardiyal koroner vazodilatasyonda bozulma olduğunu bildirmişlerdir.

Pre-klinik aşamada; uzamış sol ventrikül ejeksiyon süresi, uzamış pre-ejeksiyon periyodu ve yükselmiş son diastolik basınç tablosu görülmesi kardiyomiyopati olasılığını kuvvetlendirmektedir (Ahmed ve ark., 1975). Bu kişilerde kalp fonksiyonlarının (koroner arter hastalığı olmaksızın) defektli olmasının, ventrikül duvarı sertliğinin (stiffness) artmasından, myokardın kasılabilirliğinin azalmasından ve izovolumik gevşemenin uzamasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Shapiro, 1982).

STZ ile kronik diyabet oluşmuş sıçanlarda; kalp atım hızının azalması, pik ventrikül basıncının tepe değerinin baskılanması. sol ventrikül kasılma ve gevşeme hızının azalması gibi bozukluklar gösterilmiştir (Fein ve ark., 1981,1984; Ganguly ve ark., 1983; Pierce ve Dhalla,1981; Vadlamudi ve ark., 1982; Takeda ve ark., 1996). Dovvell (1986); 2. 4 ve 8 haftalık STZ diyabetik sıçanlarda zamana bağlı olarak değişen kardiyak fonksiyonları incelemiş ve kalp atım hızının, myokardiyal kasılma hızı (+dp/dt) ile gevşeme hızının (-dp/dt), kardiyak çıktının dereceli olarak azaldığını, arteriyel kan basıncı normal sınırlar içinde korunurken atış hacminin hafifçe arttığını, aynı zamanda isoprenalin infüzyonuna diyabetik kalbin verdiği yanıtların kontrollere oranla daha düşük olduğunu göstermişlerdir. Buna karşın Vadlemudi ve arkadaşları (1983), 3 ve 120 günlük SZT diyabetik perfüze sıçan kalbinde +dp/dt ve -dp/dt'nin kontrollerden farklı olmadığını bulmuşlardır (Vadlemudi ve ark., 1983)

Diyabetik kardiyomiyopati, erken dönemde diastolik ve geç dönemde sistolik fonksiyon bozukluğu ile karakterizedir. Diyabetik hastalarda sol ventrikülün sistolik fonksiyonu (özellikle hasta normotensif ise) diastolik fonksiyonuna oranla daha az etkilenmektedir ve araştırmalar diastolik fonksiyon bozukluğunun diyabetliler arasında 2 kat daha yaygın olduğunu göstermektedir (Raev, 1994).

Diyabetik kardiyomiyopatinin en tipik özelliği, sol ventrikül dolum anomalisidir ki bu durum sol ventrikül kompliansının azaldığını ya da gevşemenin uzadığını düşündürmektedir (Uusittupa ve ark., 1990). Şiddetli diyabette sıçan papiller kasında bazal düzeyde aksiyon potansiyeli süresi uzaması (Fein ve ark., 1980) yüksek düzeyde ise diastolde kalbin dolumunu kısıtlayabilir (Shimoni ve ark., 1994).

Diyabetik köpeklerin kalbinde sol ventrikül kompliansının azaldığı ve interstisyel bağ dokunun arttığı görülmüştür. Diyabetik sıçanların izole sol ventrikül papiller kasında ise uyunç değişmemiş ve basınç gelişimi korunmuş olmasına rağmen, gecikmiş gevşeme ile beraber kasılmanın belirgin olarak uzamış ve yavaşlamış olduğu belirtilmiştir. Bu belirtiler insulin ile kısmen geri çevrilmiştir.

Sıçanlarda diyabetin gelişimi ile beraber, kontraktil proteinler için hız kısıtlayıcı enzim olan Myozin ATPaz azalmış ve aktif NA formu daha az aktif olan V_3 formuna dönmüştür. Ayrıca gevşemenin gecikmesi ve yavaşlaması SR'de Ca^{2+} bağlanmasındaki azalma ile de bağlantılıdır (Penpargkul ve ark., 1981).

Fein ve arkadaşları (1980), yaptıkları çalışmada STZ diyabetik sıçanlarda izole ventriküler papiller kasın performansındaki değişimleri incelemişler ve majör bulgu olarak, kasın kasılma hızının baskılandığı ve papiller kasın gevşeme hızının yavaşladığını kısaca in vitro olarak kardiyak performansın azaldığını bildirmişlerdir Bu kardiyak değişimlerin hiperglisemi ile açıklanacak kadar basit olmadığı, bununla beraber diyabette kontraktil proteinlerin enzimatik aktivitesinin azaldığı ortaya konmuştur (Fein ve ark., 1980)

Aynı araştırıcılar daha sonraki çalışmalarında (1981), sol ventrikül işlevinde gözlenen depresyonun biyokimyasal temelinin SR'de (sarkoplazmik retikulum) Ca^{2+} gerialınımı ve bağlanmasındaki bozukluğa bağlamışlardır. Yapılan hayvan çalışmaları kronik diyabette gözlenen kardiyak disfonksiyonun gerçekten de myofibrillerdeki Ca^{+2} ATPaz, aktomyozin ve Myozin aktivitesinin azalması ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Fein ve ark., 1981; Pierce ve Dhalla, 1981, 1985; Takeda ve ark., 1996; Dillmann, 1980; Liu ve ark., 1996, 1997).

Diyabetin neden olduğu miyopatili bir kalp hücresinde gözlenen esas kusurun Ca^{2+}'un sarkolemma ve SR taşınımları sırasında Ca^{2+} homeostazının regülasyonunda görülmektedir. Bilindiği üzere SR, kontraktiliteyi regüle etmektedir ve Ca^{2+} salınımından ve geri alınımından sorumludur (Mc Neill ve Tahiliani. 1985) Kalpteki uyarılma-kasılma keneti için gerekli olan hücre içi $[Ca^{2+}]_i$ artışı ya ekstraselüler Ca^{2+} influx'ı ya da SR gibi intraselüler alanlardan Ca^{2+} salınması ile sağlanmaktadır (Fabiato ve Fabiato, 1977). Diyabetik bir kalpte ise bu bu taşınımın baskılandığı gösterilmiştir (Penpargkul ve ark . 1981; Lopaschuk ve ark., 1982; 1983; 1984).

Diyabetik kalpte myokardiyal sarkolemada LTCC sayısındaki azalmanın da Ca^{2+} regülasyonundaki bozuklukta etkili olduğu düşünülmektedir. LTCC memeli kalbinde uyarılma kasılma kenetinde hücrelere voltaj bağımlı Ca^{2+} girişi için başlıca yolaktır (Nilius ve ark, 1985; Bean, 1989; Cleeman ve Morad, 1991 Callewaert, 1992). Bu şekilde Ca^{2+} girişi SR'den Ca^{2+} salınımını sağladığı için. bu yolla hücre içine Ca^{2+} girişinin azalması zaten hasarlanmış olan SR aktivitesini (Penpargkul ve ark., 1981; Ganguly ve ark., 1983) ve azalmış myofibriler aktiviteyi daha da olumsuz etkileyecektir (Pierce ve Dhalla, 1985, 1981; Malhotra ve ark., 1981).

Önceki çalışmalar, diyabetik kalpte SR Ca^{2+} pompa aktivitesinin azaldığını ve buna bağlı olarak da kalbin gevşeme yeteneğini kaybettiğini göstermiştir. Bu durumun nedeni çok açık olmasa da pompanın protein düzeyindeki değişimlerle açıklanabilir (Russ ve ark., 1991; Zarain-herzberg ve ark., 1994; Dillmann, 1991; Xu ve ark., 1996). Diyabetik kalpte Ca^{2+} ile ilgili anomaliler aynı zamanda Na^{+}- Ca^{2+} değiş-tokuşcusu ile de ilgilidir (Heyliger ve ark., 1987; Makino ve ark.. 1987). Diyabette

bu enzimin aktivitesi ve Ca^{2+} bağlanması azalmıştır (Pierce ve Dhalla. 1983; Pierce ve ark., 1985).

Diyabette sarkolemmal Na^{+}- Ca^{2+} değiş-tokuşcusu aktivitesinde de kusurlar meydana gelmektedir. Bunlar, diyabetik kalbin Ca^{2+} salma yeteneğini sınırladığı için hücre içi Ca^{2+} düzeyinin yükselmesine katkıda bulunmaktadır. Na^{+}-K^{+}-ATPaz aktivitesindeki azalma, artan Na^{+} miktarı ile bağlantılı ikincil olarak hücre içi Ca^{2+} tutulumunu artırmaktadır. Buna bağlı olarak Ca^{2+} kanalları aracılığıyla Ca^{2+} girişi uyarılmaktadır. Ayrıca kronik diyabet gelişim sürecinde kalpte SR ve sarkolemal membranda yeniden yapılanma olduğuna dair de birçok veri bulunmaktadır ki bu olayın kardiyak bozukluklardaki rolünün dikkate değer olduğu düşünülmektedir (Dhalla ve ark., 1985).

Diyabetik kardiyomiyopatide beta adrenoseptörlerde (β-AR) görülen değişimlerin önemi oldukça fazladır. Kardiyak β-AR sayısındaki azalma diyabetik kardiyomiyopatinin nedenlerinden biri olarak düşünülmektedir. Ayrıca diyabette β-AR agonistlerine karşı kronotropik ve inotropik yanıtın azaldığı gösterilmiştir (Ramanadham ve Tenner, 1987; Karasu ve ark., 1990; Yu ve McNeill. 1991).

Kalp dokusunda hem β_1 hem de β_2 AR'ler bulunmaktadır (Brodde ve ark., 1984: Zerkovvski ve ark., 1986). İnsanda β_1 ve β_2 AR'ler G_s proteini aracılığıyla adenilat siklaza kenetlidir ve her iki reseptör de kontraktil güç ve sinoatrial hızdaki artışlara aracılık etmektedir (Kaumann, 1997). Yeni çalışmalarda insan kalbinde bu iki reseptörden farklı olarak G_i proteinine kenetli ve kalpte kardiyodepresan etkilere aracılık eden p_3-AR'lerinin olduğu kaydedilmiştir (Gauthier ve ark., 1996; Kaumann, 1997; Trochu ve ark., 1999). Bu reseptör aracılı etkiler yetmezlik olan hastalarda kardiyak disfonksiyona katkıda bulunmaktadır (Gauthier ve ark.. 1996)

1.6. Renin Anjiyotensin Sistemi

Kardiyovasküler sistemin regülasyonunda renin-anjiotensin sistemi (RAS) önemli rol oynamaktadır. Bu sistemin en önemli bileşeni olan anjiotensin II (AngII) dolaşıma katılarak kalp, böbrek ve damarlar gibi pek çok dokuyu etkilemektedir. AngII ayrıca otokrin ve parakrin etki de göstermekte, kendine özgü reseptörleri etkileyerek kardiyovasküler homeostazda rol oynamaktadır.(Petroff ve Mattiazzi 2001)

Renin RAS sisteminin birincil elemanı olup, juxtaglomerular hücrelerden sentezlenip kana salınan bir proteindir. Anjiyotensinojen üzerine reninin etkisi sonucu küçük bir polipeptid olan anjiotensin I (AngI) oluşur. AngI, anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) adı verilen enzimle anjiotensin II'ye (AngII) dönüştürülür (Vander ve ark., 1994; s.: 536). ACE akciğerlerde esas olarak damar endotel hücrelerinin zarı üzerine yerleşmiştir. Ayrıca böbrekte glomerüllerin endotelinde, jukstaglomerüler aparatta, proksimal tübülüslerde, kalpte ve beyinde de bulunur (Dzau, 1993; Phillips ve ark., 1993). Plazma ve dokularda bulunan α-aminopeptidaz enzimi anjiotensinden anjiotensin III'ü (AngIII) oluşturur. Adrenal korteks hariç AngIII'ün etkinliği AngII'ye göre oldukça düşüktür. AngI'in çeşitli yapılar üzerine etkinliği AngII ve AngIII 'e göre zayıftır, bu madde esas olarak AngII'ye dönüşerek etkinlik kazanır. AngII ve AngIII anjiotensinazlar tarafından hızlı bir şekilde inaktive edilir. Bunlara ek olarak, Ang II chymase, katepsin G, kimostatin-duyarlı Ang II-yapıcı enzim (CAGE), doku plazminojen aktivatörü ve tonin gibi non-ACE ve non-renin enzimlerle üretilebilmektedir (Dinh ve ark., 2001). Sistemik renin-anjiyotensin sistemine ilişkin genelleştirilmiş bir blok diyagram Şekil 1.3 de görülmektedir.

Ancak, son yıllarda RAS sisteminin elemanlarının (renin, anjiyotensinojen, Ang I, Ang II ve ACE) dokulardaki varlığının aydınlatılması, lokal RAS'ın kalpte ve diğer organlarda yer aldığı düşüncesini güçlendirmiştir (De Mello ve Danser, 2000; Dinh ve ark., 2001). ACE'in büyük kısmı (%90-99) vücut dokularında iken, yalnızca %1-10'u dolaşımda bulunur, RAS'in gerekli tüm bileşenleri damarlar, kalp ve böbrekler gibi bazı doku ve organlarda bulunur, (Dostal, 2000) Hayvan miyokardının deneysel hipertrofi ve yetersizlik modellerinde artmış ACE (Hirsch, 1991; Schunkert ve Dzau,

1990) ve renin ile anjiyotensinojen (Lindpaintner ve Lu, 1993) oluşumu saptanmıştır. Kompanse kalp yetersizliğinde dolaşım sistemindeki RAS aktivitesi göreceli olarak normal düzeydeyken bile doku RAS'in aktive olduğu düşünülmektedir (Kim ve Iwao, 2000). AngII'nin dokudaki üretimi ACE'den bağımsız bir yolla olmaktadır (kinaz yolu). Özellikle ACE kullanımına bağlı renin ve AngI düzeylerinin arttığı durumlarda bu kinaz yolunun miyokardda büyük bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir.

1.6.1. Anjiyotensin II Reseptörleri

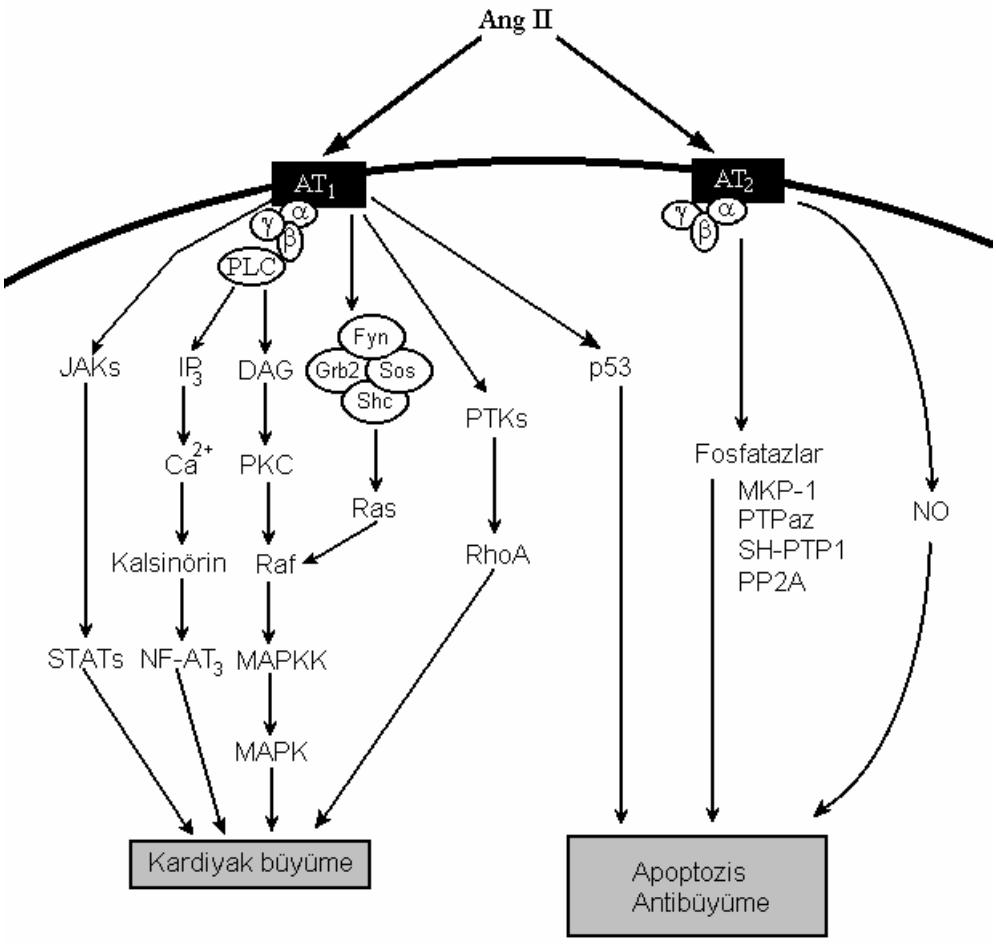
Şimdiye kadar yapılan çalışmalar 4 adet AngII reseptörü (AT) olduğunu göstermektedir. Bu reseptörler AT_1-AT_4 olarak adlandırılır (Kalantarini, 2006; İbrahim, 2006; Shirani, 2005). Bu reseptörlerin hepsinin görevi tam olarak anlaşılamamasına karşın etki mekanizmasının daha çok AT_1 ve AT_2 üzerinden gösterdiği düşünülmektedir. AT_1 ve AT_2 reseptörlerinin her ikisi de AngII'yi eşit ilgi ile bağlar ve bu reseptörler birçok dokuya yayılmıştır (Bernstein ve Berk, 1993; Bottari ve ark., 1993; Timmermans ve ark., 1992).

AT_1 reseptörleri esas olarak beyin, adrenal bezler, kalp, damar sistemi ve böbrekte yer almaktadır. AT_2 reseptörleri ise çoğunlukla fetal dönemde eksprese olmaktadır. Ancak, doğum sonrasında hızla azalmaktadırlar. Temel olarak; beyin, kalp, adrenal medulla, böbrek ve üreme dokularında bulunmaktadırlar (Dostal, 2000; De Mello ve Danser, 2000; Dinh ve ark., 2001).

Ang II reseptörlerinin sinyal iletim mekanizması iyi bilinmektedir. Ang II'nin bilinen vazokonstriksiyon, aldosteron salımı, sempatik iletimin uyarılması ve hücre büyümesi gibi hemen tüm biyolojik etkileri AT_1 reseptörü aracılığı ile gerçekleştirilir. AT_2 reseptörünün ise fonksiyonel rolü tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, anti-proliferasyon, apoptozis, farklılaşma ve vazodilatasyonda rolü olabileceği düşünülmektedir (Dostal, 2000; De Mello ve Danser, 2000; Dinh ve ark., 2001).

AT_1 reseptörü G-protein aracılı reseptör ailesinin moleküler ağırlığı 65 kDa olan bir üyesidir. Heteromerik G proteinlerinden $G_{q\alpha}$ veya $G_{i\alpha}$ ile etkileşmektedir. Ang II'nin bağlanması ve AT_1 reseptörlerinin aktivasyonu, ya G_q aracılığı ile fosfolipaz C (PLC)'nin uyarılmasıyla ya da G_i'nin adenilat siklazı (AC) inhibe etmesiyle sonuçlanmaktadır (Chung ve Unger, 1998). PLC'nin uyarılmasını takip eden protein kinaz C (PKC) aktivasyonu hücre içi depolardan Ca^{2+} salınması ve L-tipi Ca^{2+} kanallarının açılması gibi çeşitli olayların başlamasına neden olmaktadır (Chung ve Unger, 1998; Dostal, 2000; Baker ve ark., 1992). Buna ek olarak, tirozin kinazın ve mitojenle-aktiflenmiş protein kinaz (MAPK)'ın fosforilasyonu gerçekleşmektedir (Dostal, 2000; De Mello ve Danser, 2000; Dinh ve ark., 2001).

AT_2 reseptörleri kinin/NO/cGMP sistemini aktive etmekte ve protein tirozin fosfataz (PTP) ve serin/treonin fosfataz'ı uyarmaktadır. PTP stimülasyonu AT_1 reseptörünün aktive ettiği MAPK'yı etkisiz hale getirmektedir. Buna ek olarak, AT_1 reseptör uyarımının mitojenik veya hipertrofik cevabının kaynağı olan ekstraselüler sinyal-regüleli kinaz'ın aktivasyonu, AT_2 reseptörünün uyardığı serin/treonin fosfataz 2A ile tersine çevrilebilir. Bunlar, iki reseptör sistemi arasında birbirine zıt yönde etkileşimin olabileceğini düşündürmektedir. Kardiyak hücrelerde anjiyotensinin sinyal iletim mekanizması Şekil 1.4 de genel olarak şematize edilmiştir.



Şekil 1.4. Kardiyak hücrelerde anjiyotensinin sinyal iletim mekanizması. PLC, fosfolipaz C; IP_3, inositol trifosfat; DAG, diaçil gliserol; PKC, protein kinaz C; MAPK, mitojenle-aktiflenen protein kinaz; PTKs, protein tirozin kinazlar; MKP-1, MAPK fosfataz-1; PTPaz, protein tirozin fosfataz; PP2A, serin/treonin fosfataz 2A; SH-PTP, Src homolojik yapısı içeren tirozin fosfataz; NO, nitrik oksid; JAK2, janus kinaz-2 (Dostal, 2000).

1.6.2. Anjiyotensin II ve Diyabet İlişkisi

RAS sistemi bileşenlerinin (renin, anjiyotensinojen, Ang I, Ang II ve ACE) hedef dokulardaki varlığının ortaya konması, lokal renin-anjiyotensin sisteminin kalpte ve diğer organlardaki fonksiyon bozukluklarında rol aldığı düşüncesini güçlendirmiştir (De Mello ve Danser, 2000).

Anjiyotensin II reseptör blokörlerinin kullanılmasının diyabetin yol açtığı kalp yetmezliklerini, perfüzyon bozukluklarını ve glikoz taşıyıcılarındaki azalmayı

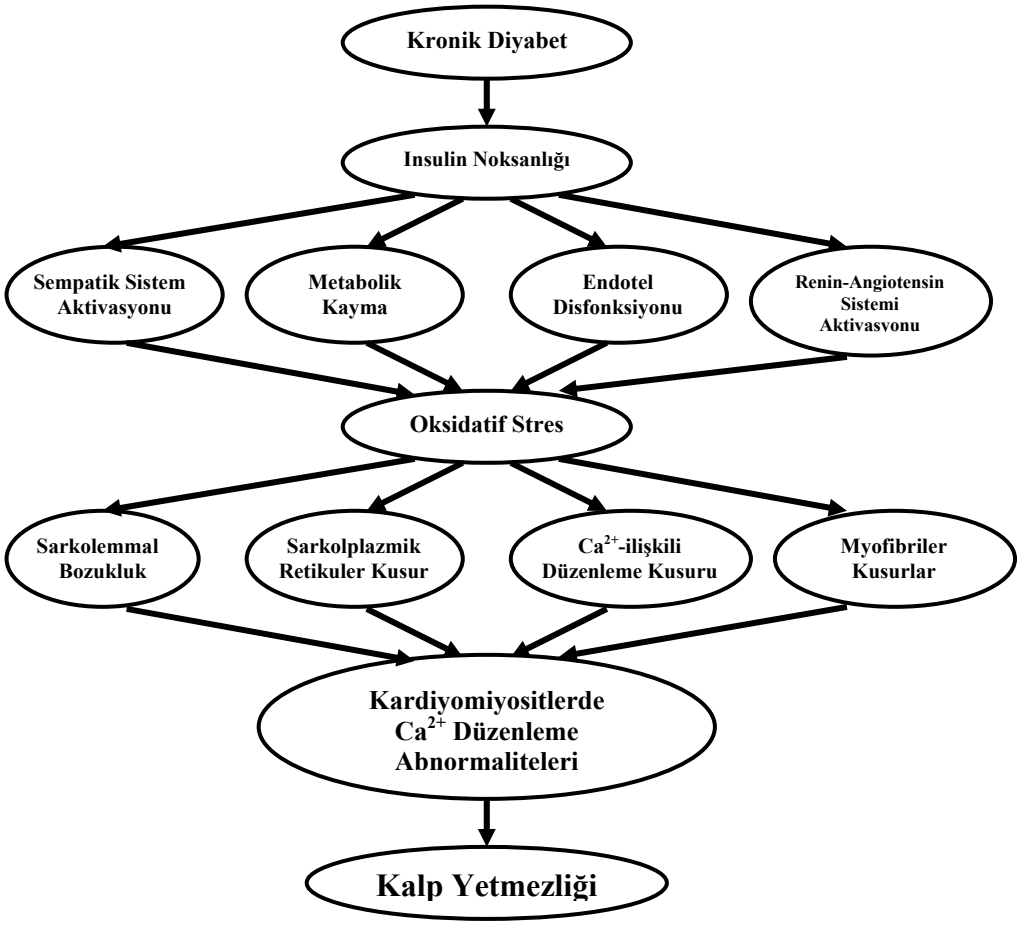
engelleyebildiğine ilişkin bulgulara rastlanmıştır (Hoenack ve Roesen, 1996; Dhalla ve ark., 1998). Hipergliseminin Ang II reseptör sayısını arttırdığı bilinmekte (Sechi ve ark., 1994; Brown ve ark., 1997) ve bu reseptörler üzerinden diaçilgliserol (DAG) oluşturarak PKC'nin çeşitli izoformlarını aktive ettiği varsayılmaktadır. AT_1 reseptör blokajının hiperglisemik durumda bile enzim dağılımını insülin gibi normale çevirmesi (Malhotra ve ark., 1997), hipergliseminin PKCε aktivasyonunu bu reseptör aracılı yoldan gerçekleştirdiğini düşündürmektedir (Ishii ve ark., 1998; Shimoni, 1999).

Shimoni (2001) diyabetli sıçan kalbinde uzadığı bilinen AP süresinin hem AT_1 blokörü olan valsartan hem de ACE inhibitörleri ile kısaldığını ve AP uzamasında rolü olan I_{to} daki azalmanın da bu ajanlarla normale döndüğünü gözlemiştir. Yine Fiordaliso ve ark. (2000) STZ uygulaması ile kalpte RAS elemanlarının ekspresyonunda artış olduğunu ve AT_1 blokörü olan losartan uygulamasının hem diyabetin yol açtığı hücre ölümünü hem de artan Ang II seviyesini düşürdüğünü göstermişlerdir. Bununla birlikte, köpek epikard miyositleri Ang II ile inkübe edildiğinde diyabetle benzer şekilde, K^+ akımlarının azaldığı ve losartan uygulamasının bu etkiyi ortadan kaldırdığı gözlenmiştir (Yu ve ark., 2000). Ayrıca, Aiello ve ark. (2001) Ang II'nin kardiyak Ca^{2+} akımlarını uyardığını ve bu etkinin yine PKC aktivasyonuyla gerçekleştiğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada, aynı etkinin PKC'nin doğrudan aktivasyonu ile de gözlendiği ve hem AT_1 blokörü uygulamasının hem de özgül PKC inhibitörlerinin bu artışı baskıladığı gösterilmiştir.

1.6.3. Oksidan Stress ve Diyabet İlişkisi

Klinik ve deneysel bulgular, diyabetik komplikasyonların patogenezinde serbest radikal aracılı oksidadif süreçlerin etkili olduğunu göstermektedir (Frank, 1991; Wohaieb ve Godin, 1987; Thompon ve ark, 1992; Giugliano ve ark, 1995; Fonseca ve ark, 1997). Serbest radikal üretiminin artışı hiperglisemi ile tetiklenen glukoz oksidasyonu, protein glikolizasyonu ve bunu izleyen glikalize proteinlerin oksidatif yıkımı sonuçunda oluşmaktadır (Gillery ve ark, 1988, Wolff ve Dean, 1987, Hunt ve ark, 1990). Ayrıca, kronik tip 1 diyabette insulin eksikliğine bağlı olarak gelişen

oksidan stres ve sonraki adımlarla kalpte gelişen fonksiyon bozuklukları çeşitli derleme makalelerinde tartışılmıştır. Şekil 1.5 te, bu önerilen mekanizmalardan biri özetlenmiştir (Dhalla ve ark, 1998).



Şekil 1.5. Diyabetik kardiyomiyopati gelişimi sırasında oksidatif stresin neden olduğu kalp yetmezliği için önerilen mekanizma (Dhalla ve ark, 1998).

Antioksidanlar ve antioksidan enzimler gibi hücre savunma mekanizmaları hücreyi reaktif serbest radikaller ve diğer oksidan türlere karşı korumada temel rol almalarından dolayı bu koruma faktörlerin bozulması ve/veya tamamen ortadan kalkması diyabetik kardiyomiyopatinin gelişimi sırasında oksidatif stresi geliştirecektir (Freeman ve Crapo, 1982). Buna karşın, bazı çalışmalarda diyabetik sıçan kalplerinde superoxide dismutase, glutathione peroxidase ve catalase aktivitelerinde artış gözlenmiştir (Kakar ve ark., 1995; 1996; Mak ve ark., 1996). Doku antioksidan seviyeleri diyabetin erken dönemlerinde adaptasyon göstererek

artmasına rağmen bu antioksidan rezervleri zamanla azalacak ve bu denge oksidatif hasar oluşturacak yönde kayacak ve sonucunda kalp yetmezliğine yol açacaktır. Doku antioksidan seviyesinin durumu oksidatif stresi ve doku fonksiyonunun belirlenmesinde tek başına etkili değildir. Bununla birlikte, endotel fonksiyonunda meydana gelecek bozukluklarda oksidatif strese yol açmaktadır (Dhalla ve ark, 1998).

Vitamin E ve diğer antioksidanlar ile diyabet tedavisi, dokuların antioksidan düzeylerini arttırdığı, insulin aktivitesini geliştirdiği, endotel fonksiyonlarını düzelttiği, serum lipidlerinin oksidasyonunu engellediği, protein glikolizasyonunun azaldığı ve oksidatif yükün azaldığını ortaya konmuştur. Bu sonuçlar, Diyabetik kardiyomiyopati gibi çeşitli organlarda diyabetin yol açtığı komplikasyonlarda oksidatif stresin rolünü kanıtlamaktadır (Dhalla ve ark., 1998; Ayaz ve ark., 2004).

1.7. Çalışmanın Amacı

Kalpte hücre içi serbest Ca^{2+} konsantrasyonunun ($[Ca^{2+}]_i$) dinlenim (bazal) ve uyarılmış (transient-geçici) durumlardaki değerleri kalbin rutin-doğal işlevlerini yerine getirebilmesi için çok önemli role sahiptir. Diyabetik kalp dokularında $[Ca^{2+}]_i$ değişimlerinin gözlenmesine ilişkin yapılan çalışmalarda; diyabette $[Ca^{2+}]_i$'nun hem bazal ve hemde uyarılmış durumlarıyla ilgili olarak artmış, azalmış veya değişmemiş gibi çelişkili veriler bulunmaktadır. Diğer yandan diyabette ortaya çıkan kardiyomiyopatide spontan lokal Ca^{2+}-salınımına (spark) ait bilgi henüz mevcut değildir.

Kısaca, diyabetik kalpte, kardiyomiyositlerde $[Ca^{2+}]_i$'un nasıl değiştiği ve bu değişimin diyabetik kardiyomiyopatinin oluşumundaki rolünün ve mekanizmasının henüz açıklığa kavuşturulamamış olduğu açıktır. Diğer yandan, hiperglisemik durumda RAS sisteminin etkinliğinin artmış olması (Sechi ve ark., 1994; Brown ve ark., 1997; Malhotra ve ark., 1997; Malhotra ve ark., 2001; Shimoni, 2001), Ang II'nin ve aktive ettiği habercilerin bu değişikliklerde önemli bir rolü olabileceğini göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda AT_1 reseptör blokörü olduğu ileri sürülen ve bu amaçla ilaç şeklinde de kullanılan candesartan-cilexetil'in deneysel diyabet modelinde kalpte oluşan elektriksel ve mekanik değişiklikleri düzelttiği gösterilmiştir (Tsujino ve ark, 2006; Kosugi ve ark, 2006; Yusuf ve ark, 2005; Matsumori, 2005; Hayashi ve ark, 2003).

Laboratuarımızda daha önce diyabetik kardiyomiyositlerle yapılan çalışmada Ca^{2+} akımlarında bir değişiklik gözlenmezken Ca^{2+} transientlerinin tepeye çıkış süresi (TP)'nin ve tepeden %50'sine iniş süresi (DT_{50})'nin arttığını, buna karşılık genliğin azaldığını gösterilmişti (Özdemir ve ark 2005). Ayrıca, bu hücrelerin bazal Ca^{2+} seviyelerinin de arttığı gözlenmişti. Bununla birlikte, bir AT_1 reseptör blokörü olan candesartan-cilexetil (5 mg/kg/gün, 4 hafta süreyle) kronik uygulamasının diyabetli ventrikül hücrelerinde bazal Ca^{2+} seviyelerini ve Ca^{2+}-transientlerinin değişmiş olan kinetik parametrelerini kontrol hücreleri seviyelerine çektiği ortaya konmuştu. Ayrıca, candesartan-cilexetil verilmesi diyabetik sıçanlarda uzamış olan AP süresini ve baskılanmış olan K^+ akımlarını düzeltmektedir. Diyabetik sıçan izole

kardiyoniyositleri protein kinaz C (PKC) inhibitörü olan bisindolylmaleimide I (BIM) ile inkübe edildiğinde, hücre içi Ca^{2+} transientlerinin kinetiklerini candesartan-cilexetil uygulamasına benzer şekilde etkilediği gösterilmişti.

Bu çalışmada, daha önce yapılan çalışmalarımızdan yola çıkılarak izole sıçan kardiyomiyositleri AT_1 blokörü olan candesartan ve PKC inhibitörü olan bisindolylmaleimid I (BIM) ile inkübe edilerek hem diyabetli kalbin Ca^{2+} homeostazında Ang II'nin direkt rolü hem de bu etki ile ilgili etkinin kullandığı sinyal yolağının aydınlatılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL METOD

2.1. Deneysel Diyabetin Oluşturulması

Deneyler için, ağırlıkları 200-250 g arasında değişen, yaklaşık 3 aylık, 80 adet Wistar türü erkek sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar, deney süresi boyunca her kafeste 3 tane olacak şekilde, su ve yem kısıtlaması olmaksızın tutulmuşlardır. Tüm hayvanların açlık kan şekeri düzeyleri ve vücut ağırlıkları deneyin başlangıcında ölçülmüştür. Diyabetli hayvan oluşturmak için, hayvanların bir grubuna hayvanlara tek doz streptozotocin (STZ; 50 mg/kg) intraperitoneal (*i.p.*) olarak enjekte edilmiştir. STZ enjeksiyonundan 1 hafta sonra hayvanların açlık kan şeker düzeyleri ölçülerek kan şeker düzeyleri 300 mg/dl ve üzerinde olan hayvanlar diyabetik olarak kabul edilmiştir. Kontrol grubu (K) hayvanlarına STZ taşıyıcısı olan sitrat (0,1 mol/l, pH=4,5 sitrat tamponu) enjeksiyonu yapılmış ve 1 hafta sonra tekrar açlık kan şekeri düzeyleri ölçülmüş ve bu hayvanlar K grubu olarak 4 hafta boyunca standart koşullarda kafeslerde tutulmuşlardır.

Kan şekerinin tam olarak yükseldiği ve kararlı kaldığı ilk haftadan itibaren tüm hayvanlar 4 hafta daha tutularak 5. hafta sonunda tekrar açlık kan şekeri düzeyleri ve vücut ağırlıkları ölçüldükten sonra sıçanlar deneye alınmışlardır.

2.2. Kardiyomiyositlerin Elde Edilmesi

Kalp dokusundan tek kalp hücrelerinin (kardiyomiyosit) izolasyonu enzimatik yöntemle yapılmıştır (Özdemir ve ark., 2005). Deney süresi sonrası, hayvanlar sodyum pento barbital kullanılarak (30 mg/kg vucüt ağırlığı) hafif anestezi altına alınmış ve gögüs açılarak kalpleri hızlı bir şekilde çıkarıldıktan sonra Langendorff sistemine aorttan bağlanmıştır. Langendorff sisteminde kullanılan perfüzyon çözeltisinin içeriği (mM olarak): 145 NaCl; 5 KCl; 1,2 $MgSO_4$; 1,4 Na_2HPO_4; 0,4 NaH_2PO_4; 5 HEPES; 10 glukoz olup bu çözeltinin pH'sının 7,4 dengesinin sağlanması için % 5 CO_2 -% 95 O_2 ile 10 dakika önceden gazlanmıştır. Kalpler önce bu Ca^{2+} içermeyen çözelti ile 5 dakika

perfüze edilerek tüm kan ve diğer sıvılardan temizlenmişlerdir. Bu işlemi takiben, kalpler 30–35 dakika süre ile içerisinde kollajenaz bulunan aynı çözelti (Roche, Collagenase A type) (1–1,2 mg/ml) ile perfüze edilerek kalbin kollejen dokusunun parçalanması sağlanmıştır. Daha sonra, sistemden ayrılan ve atriyumları ve diğer dokuları tamamen çıkarılan kalpler küçük bir kabın içine alınmış (Ca^{2+} içermeyen perfüzyon çözeltisi ile) ve makasla ince ince dilimlenmiştir. Daha sonra, ince bir filtreden geçirilerek hücreler bir tüpün içerisine alınmış ve birkaç yıkama işleminden geçirilmiştir. Çözeltide Ca^{2+} aşamalı olarak arttırılmış ve son olarak ortamda 1 mM Ca^{2+} olan çözelti içinde hücreler 37°C'de 1 saat kadar inkübatörde tutulmuşlardır.

Birinci grup çalışmamızda, kontrol grubundan ve diyabetli grup sıçan kalplerinden izole edilen kardiyomiyositler eşzamanlı olarak L-tipi Ca^{2+} kanal akımı, bazal ve geçici Ca^{2+} değişimi (transient) ölçümü, Ca^{2+} spark ölçümü ve diğer biyokimyasal ölçümler (protein kinaz C, ryanodin reseptör fosforilazasyonu, thiol oksidasyonu gibi) için kullanılmıştır.

İkinci grup çalışmamızda, kardiyomiyosit izolasyonu ile tek hücre elde edilmesinin ardından, kontrol (K) ve diyabetli (DM) hayvanların miyositleri 3 bölünerek, bir grubu standart koşullarda, bir diğer bölümü 10 μM anjiyotensin tip 1 reseptör blokörü olan candesartan ile (K+Can ve DM+Can grupları olmak üzere) ve diğer bölümü ise100 nM protein kinaz C inhibitörü olan bisindolylmaleimide I ile (K+BIM ve DM+BIM grupları olmak üzere) ile 37°C'de 6–8 saat süre ile inkübe edilmişler ve sonra ölçümlerde kullanılmışlardır.

2.3 L-tipi Ca^{2+} Kanal Akımı Ölçümü

Bu çalışmanın ilk bölümünde L-tipi Ca^{2+} kanal akımları (I_{CaL}) ölçülmüştür. Bu akımlar tüm hücre voltaj kenetleme konfigürasyonunda 1,5-2,0 MΩ'luk elektrotlar kullanılarak alınmıştır. Ölçümler için kullanılan pipet solüsyonu (mM): 110 Cs-aspartat; 20 CsCl; 1,0 $MgC1_2$; 5,0 fosfokreatin-Na_2; 5 ATP-Na_2; 10 EGTA ve 5 HEPES (pH= 7,4).

Kayıt için, hücreler –80 mV düzeyinde kenetlenerek eğimli bir voltaj uygulaması ile zar potansiyeli–45 mV'a kenetlenmiş, bu seviyede bir süre beklenerek sodyum (Na^+) akımları inaktif hale getirilmiştir. Sonra –50 mV'tan 10 mV'luk artışlarla +60 mV'a 300 ms'lik depolarize edici pulslar uygulanarak 12 farklı voltaj seviyesinde kayıtlar alınmış ve bilgisayara kaydedilerek Clampfit 8.0 programı ile analiz edilmişlerdir. Tepe değerleri ölçülüp 200 ms'nin sonundaki kuyruk akımlarından çıkarılmıştır. Her potansiyel için elde edilen akım değeri ölçüm yapılan hücrenin ölçülen sığasına bölünerek değerlendirilmiş ve tüm akım değerleri akım yoğunluğunun voltaja göre değişimi olarak verilmiştir.

2.4 Bazal ve Geçici Hücreiçi Ca^{2+} Değişimi (Ca^{2+} transient) Ölçümü

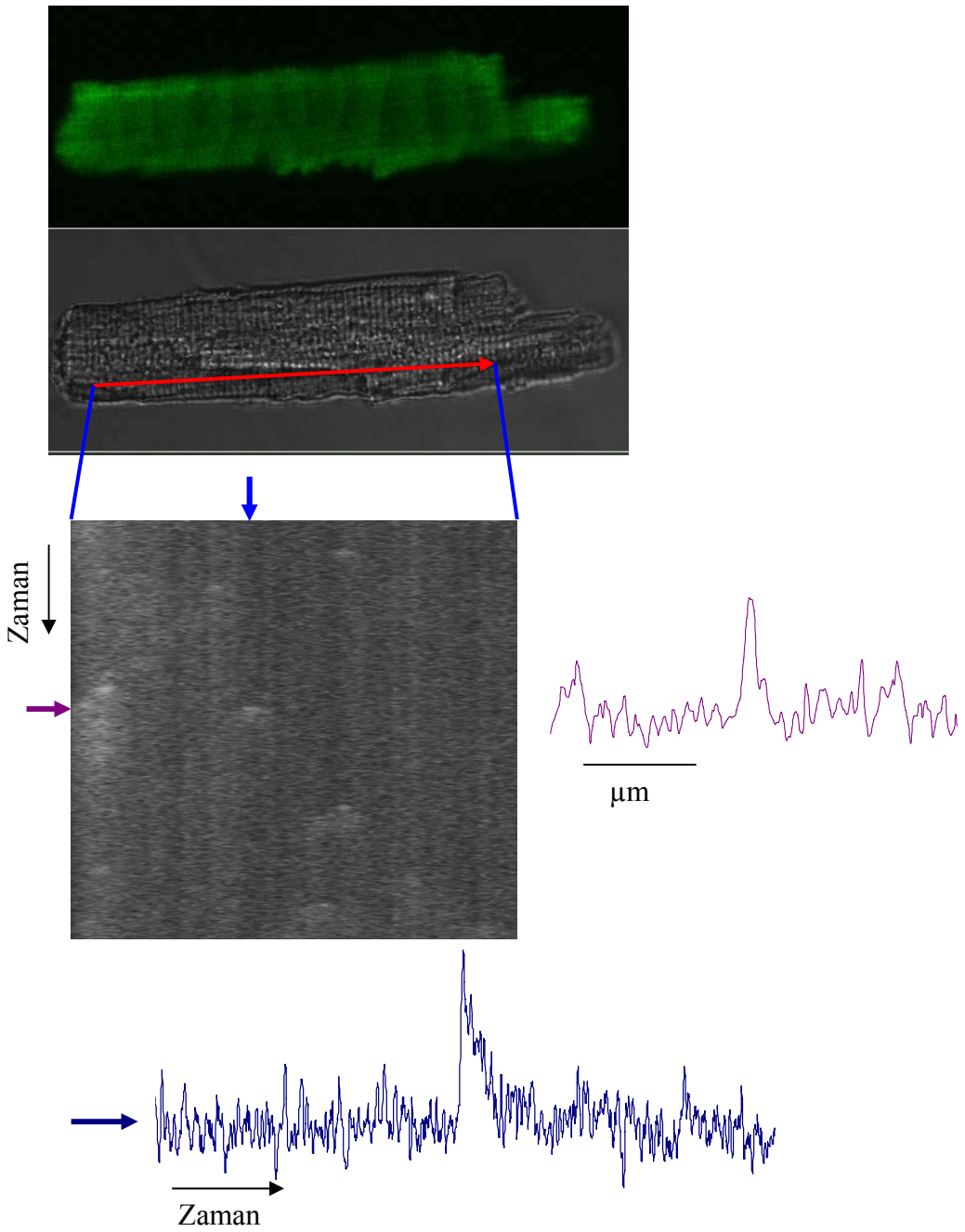
İzole edilen kardiyomiyositler fura-2 AM (4 μM) ile oda sıcaklığında 45-50 dakika inkübe edildikten sonra, 340 ve 380 nm'de eksite edilerek 510 nm' ye merkezlenmiş floresan oranların ölçülmesi ile $[Ca^{2+}]_i$ hesaplanmıştır (Grynkiewicz ve ark., 1985). Hücre içi serbest Ca^{2+} ölçüm deneylerinde kullanılan banyo çözeltisinin içeriği şu şekildedir (mM): 130 NaCl; 4,8 KCl; 1,2 $MgSO_4$; 1,5 $CaCl_2$; 1,2 KH_2PO_4; 10 HEPES ve 10 glucose (pH= 7,4). İki ucuna elektrot yerleştirilmiş küvet içine alınan hücrelerden uyarılabilir olanı seçilerek bir pencere içine alınmıştır. Önce 20 s'lik bazal Ca^{2+} sinyali kaydedilmiş, sonra hücreler 25–30 V'luk pulslar ile 0,2 Hz frekansında uyarılarak 200 s süreyle geçici hücreiçi Ca^{2+} değişimleri (Ca^{2+} transient) kaydedilmiştir. Arkasından aynı pencere banyonun hücre bulunmayan bir bölgesine odaklanarak belli bir süre kayıt alınıp hücre içi sinyalden çıkarılmıştır. Böylece, banyo ortamının floresansından kaynaklanabilecek gürültünün ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Gözlenen Ca^{2+} değişimine ait sinyallerin ölçümü PTI (Photon Technology Internetional) RatioMaster marka mikrospektroflorimetre ile yapılarak Felix (PTI) programı ile bilgisayara kaydedilip değerlendirilmiştir. Transientlerin kinetik analizi Micosoft Excell programı ile hazırlanan bir analiz algoritması ile gama dağılım fonksiyonuna uydurularak gerçekleştirilmiştir. Her hücre 200 s süresince kaydedilen transientlerin parametrelerinin ortalamasından elde edilen değer ile temsil edilmiştir. $[Ca^{2+}]_i$ sinyallerinin bazal değerden çıkarılarak ölçülen maksimum değeri ($\triangle F_{340/380}$), tepeye çıkış süresi (TP) ve maksimum değerin % 50'sine iniş süresi (DT_{50}) ölçülerek karşılaştırılmıştır.

2.5. Lokal Ca^{2+} Salınımı (Ca^{2+} Spark) Ölçümü

Enzimatik yolla izole edilen kardiyomiyositler, içeriği (mM) 137 NaCl; 5,4 KCl; 1,2 $MgCl_2$;1 NaH_2PO_4; 1 $CaCl_2$; 20 glucose, and 20 HEPES (pH 7,4) olan tampon çözeltisine aktarılmıştır. Kalp miyositleri burada 8 mM fluo-3 AM ile karanlık ortamda 25 dakika inkübe edildikten sonra 3 kez tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Deney kabına aktarılan kardiyomiyositlerin cam tabana oturması beklenildikten sonra Zeiss LSM–510 inverted konfokal mikroskop (Carl Zeiss, Inc, Germany) yardımı ile doğrusal tarama modunda oluşturulan görüntüler kaydedilmiştir. Taranan doğru (512 piksel) myositlerin uzun eksenine gelecek şekilde ayarlanmıştır. Her görüntü, 1,9 ms aralıklar ile yaklaşık 4 saniye, Zeiss Plan-Neofluar 40X yağ imersiyon (NA 1,3) objektif yardımıyla oda sıcaklığında (20–22°C) kaydedilmiştir. Konfokal pinhol 1–1,5 airy birime ayarlanmıştır.

Kaydedilen spark ölçüm resimleri LSM5 Image Examiner programı ile değerlendirilmiştir. Resimlerin F değeri potansiyel spark bölgeleri dışında kalan yerlerin şiddet (intensity) değerleri ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Bu F değeri kullanılarak $\triangle F/F$ resimleri oluşturulmuştur. Spark bölgeleri manual olarak tayin edilerek, bu bölgelerin 3–4 piksel genişliğinde zaman grafikleri çizdirilmiştir.

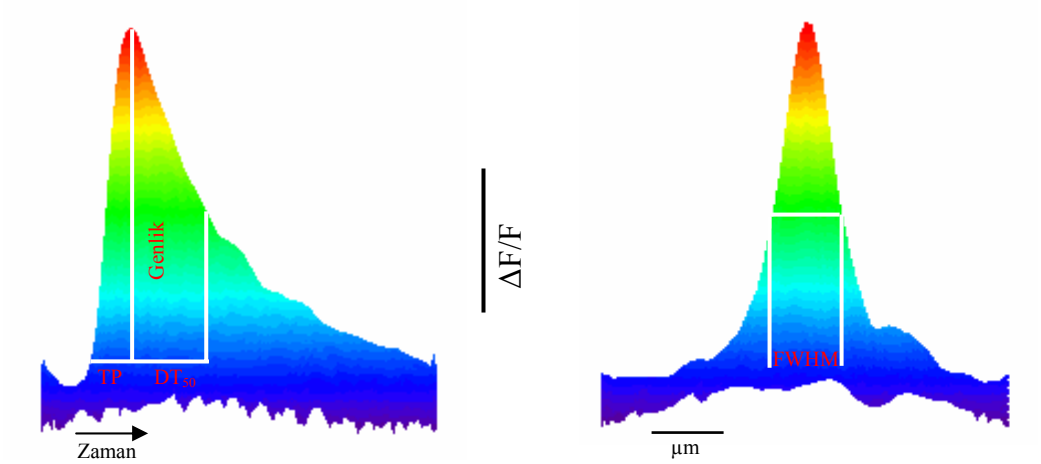
Şekil 2.2 de, canlı bir kardiyomiyosit, ve bu miyositten tesbit edilen bölge ve kaydedilen sparklar görülmektedir.



Şekil 2.1. Kardiyak hücrelerden Ca^{2+} spark kayıt ve analiz için oluşturulan grafikler. Fluo-3 ile yüklenmiş bir kardiyomiyositin konfokal miksoskop ile alınan flurasan ve gerçek görüntüsü en üstte görülmektedir. Hücre üzerinde boyuna tanımlanan doğrunun zaman içinde değişimi ortadaki grafiği oluşturmaktadır. 4–5 piksel genişliğinde zamansal (mavi eğri) ve uzaysal ortalama eğrisi ile (kırmızı eğri) spark parametreleri hesaplanmıştır.

Yerel Ca^{2+} sinyallerinin kinetik analizi Microsoft Excell programı ile hazırlanan bir analiz algoritması ile gama dağılım fonksiyonuna uydurularak gerçekleştirilmiştir. Ardından, bu grafiklerin maksimum değeri ($\triangle F/F$), tepeye çıkış süresi (TP) ve maksimum değerin % 50'sine iniş süresi (DT_{50}), tepe değerinin %50 ye indiği

bölgede spark genişliği (FWHM) fonksiyon uydurma işlemi yardımıyla ölçülerek karşılaştırılmıştır. Bu ölçümleri takiben, kaydedilen resimlerde sparklar sayılarak her resim için µm ve saniye başına frekans değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 2.2. Kardiyak hücrelerden kaydedilen bir Ca^{2+} spark üzerinde ölçülen parametreler. En yüksek ΔF/F değeri genlik, bazal seviyeden tepe değerine ulaşma süresi, TP; Tepe değerinin %50'sine düşmesi için geçen süre, DT_{50}; Tepe değerin yarısında oluşan kalınlık FWHM ile gösterilmektedir.

2.6. Eşzamanlı Ca^{2+} Akımı ve ve Hücre İçi Serbest Ca^{2+} Derişimi Ölçümü

Çalışmanın bir bölümünde L-tipi Ca^{2+} kanal akımları (I_{CaL}) ve hücreiçi serbest Ca^{2+} derişimi ($[Ca^{2+}]_i$) eşzamanlı olarak ölçülmüştür. Bu akımlar tüm hücre voltaj kenetleme konfigürasyonunda 1-1,5 MΩ'luk elektrotlar kullanılarak kaydedilmiştir. Ölçümler için pipet solüsyonu olarak (mM): 130 CsCl; 0,4 $MgC1_2$; 20 TEA-Cl; 4 MgATP; 10 HEPES (pH= 7,2) ve 50µM fura-2 (pentapotasyum tuzu) kullanılmıştır. Banyo solusyonu ise (mM):135 NaCl; 1 $MgCl_2$;20 CsCl;1,8 CaCl; 10 glucose; ve 10 HEPES (pH 7,4) içermektedir. Simultane ölçümü gerçekleştirebilmek için voltaj kenetlemenin tüm hücre konfigurasyonunda hücrelerde "giga-seal" sağlandıktan ve pipet içerisindeki zar parçası akım yardımı ile parçalandıktan sonra Ca^{2+} duyarlı boyanın hüçreiçine geçebilmesi için 10 dakika beklenmiştir. Boyanın hüçreiçine geçişini kolaylıştırmak amacı ile küçük pozitif akım pulsları kullanılmıştır. "Giga-seal" oluşturulan hücre PMT üzerinde bulunan pencere içine alınarak PMT kaydı başlatılmıştır. Fura-2 340 ve 380 nm'de eksite edilerek 510 nm' ye merkezlenmiş floresan oranların ölçülmesi ile $[Ca^{2+}]_i$ değişimi gözlenmiştir. Bu işlemi takiben akım

kaydına geçilmiştir. Kayıt için, hücreler –80 mV düzeyinde kenetlenerek eğimli bir voltaj uygulaması ile zar potansiyeli –45 mV'a kenetlenmiş, bu seviyede bir süre beklenerek Na^+-kanalları katkısı ortadan kaldırılarak sadece Ca^{2+}-kanal akımları ölçülmüştür. Sonra –50 mV'tan 10 mV'luk artışlarla +60 mV'a 300 ms'lik depolarize edici pulslar uygulanarak 12 farklı voltaj seviyesinde kayıtlar alınmış ve bilgisayara kaydedilerek Clampfit 8.0 programı ile analiz edilmişlerdir. Akım kayıtları HEKA marka EPC8 model patch-clamp amfisi kullanılarak kaydedilmişitr. Tepe değerleri ölçülüp 200 ms'nin sonundaki kuyruk akımlarından çıkarılmıştır. Her potansiyel için elde edilen akım değeri ölçüm yapılan hücrenin ölçülen sığasına bölünerek değerlendirilmiş ve tüm akım değerleri akım yoğunluğunun voltaja göre değişimi olarak verilmiştir.

Akım kaydı sonrasında aynı pencere banyonun hücre bulunmayan bir bölgesine odaklanarak belli bir süre kayıt alınıp hücre içi sinyalden çıkarılmıştır. Böylece, banyo ortamının floresansından kaynaklanabilecek gürültünün ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Gözlenen Ca^{2+} değişimine ait sinyallerin ölçümü PTI (Photon Technology Internetional) RatioMaster marka mikrospektroflorimetre ile yapılarak Felix (PTI) programı ile bilgisayara kaydedilip değerlendirilmiştir. Transientlerin kinetik analizi Microsoft Excell programı ile hazırlanan bir analiz algoritması ile gama dağılım fonksiyonuna uydurularak gerçekleştirilmiştir. $[Ca^{2+}]_i$ sinyallerinin bazal değerden çıkarılarak ölçülen maksimum değeri ($\triangle F_{340/380}$), tepeye çıkış süresi (TP) ve maksimum değerin % 50'sine iniş süresi (DT_{50}) ölçülerek karşılaştırılmıştır.

2.7. Protein Seviyesi Ölçümleri: Western Blot

Deney gruplarından tek hücre izolasyonunu takiben kardiyomiyositler içeriği (mM) 50 Tris-HCl, 200 NaCl, 20 NaF, 1,0 Na_3VO_4, 1,0 dithiothreitol ve proteaz inhibitörü (Roche) olan 2 ml'lik tamponda teflon-cam homojenatör ile 4°C de homojenize edilmiştir. İlk olarak, homojenatlar 1000x g de 30 dakika santrifuj edilmiştir. Daha sonra, supernatantlar alınarak 30 000xg de 30 dakika sanrifuj edilmiş ve pellet homojenizasyon tamponu içinde çözülerek membran kısmı olarak muhafaza edilmiştir. Bu işlemden elde edilen supernanatlar alınarak 100.000xg de 1 saat yeniden santrifuj edilmiştir. Supernatant, sitozolik kısım olarak saklanırken, pellet homojenizasyon tamponu içinde çözülerek SR

vezikülü olarak saklanmıştır. Protein miktarı Bradfort yöntemi (Bradford, 1976) ile tayin edilerek elektroforez deneyleri için kullanılana kadar -80 ^{o}C de dondurulmuştur.

2.7.1. RYR Protein Seviyesi ve Fosforilasyon Düzeyi

Tampon içerisinde bulunan SR vezikülleri %5 lik SDS-PAGE jel içerisine 100 µg protein olacak şekilde yüklenerek 150 V da 2 saat yürütülmüştür. Proteinler 100 mA akım altında bir gecelik transferin sonunda nitroselluloz membrana aktarılmıştır (Laemmli, 1970). Non-spesifik bağlanmaları önlemek amacıyla, membran PBS/süt içerisinde oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat boyunca bekletildikten sonra PBS tamponu (20mM NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 (pH 7.6), 154 mM NaCl, 3% bovine serum albumin) ile yıkanarak RYR5029 Ab (1:5 000) veya RYR-P2809 Ab (1:3 000) (Marx ve ark., 2000) ile 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda membranlar 3x10 dakikalık yıkamanın ardından anti rabbit IgG-peroxidase ile 1 saat yeniden inkübe edilerek, 1x15 ve 3x10 dakikalık yıkama yapılarak luminasans filme aktarılmıştır. Analizler film üzerinden yapılmıştır.

2.7.2. PKC Protein Seviyesi

Santrifuj işlemi ile elde edilen hücrelerin membran ve sitozolik kısımları ayrıca PKC ölçümleri için kullanılmıştır. Tampon içerisinde bulunan membran ve sitozolik örnekler %10 luk SDS-PAGE jel içerisine 30 µg protein olacak şekilde yüklenerek 65mA de 1 saat yürütülmüştür.

Proteinler 45 mA akım altında 1 saat süreli transfer ile nitroselluloz membrana aktarılmıştır. Non-spesifik bağlanmaları önlemek amacıyla, membran PBS/süt içerisinde oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat boyunca bekletildikten sonra PBS tamponu (20mM NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 (pH 7.6), 154 mM NaCl, 3% bovine serum albumin) ile yıkanarak PKC Ab (Santa Cruz) ile 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda membranlar 3x10 dakikalık yıkamanın ardından anti rabbit IgG-peroxidase (1 / 10,000) ile 1 saat yeniden inkübe edilerek, 1x15 ve 3x10 dakikalık yıkamanın

ardından luminasans filme aktarılmıştır. Bilgisayara aktarılan film görüntüsü üzerinden luminasans miktarı uygun bir program yardımıyla belirlenmiştir.

2.7.3. Thiol oksidasyon ölçümü

İzole kardiyomiyositler önce içeriği (mM): 123 NaCl, 5,4 KCl, 1,7 $MgCl_2$, 1,8 $CaCl_2$, 10 HEPES, and 10 glucose (pH 7,4) olan HEPES tamponu ile yıkandıktan sonra % 2 sodium dodecylsulfate içeren 0,2 M Tris/HCl (pH 8,1) tamponu ile parçalanmaları sağlandı. Ölcüm Ellman ayıracı kullanılarak belirlendi. Total SH grup ölçümü için, 0,05 ml parçalanmış hücre solüsyonundan alınarak 0,8 ml saf su ve 0,1 ml 2 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) ile karıştırarak 20 dakika renk oluşumu için beklendi. Beklemeden dolayı oluşan supernatantların 412 nm dalga boyunda absorbansları okundu. Asit soluble SH grupları belirlemek amacıyla 0,7 ml parçalanmış hücre solüsyonu ile 0,35 ml %20 lik trichloroacetic acid (TCA) karıştırılarak 13.000xg de 10 dakika santrifuj edildi. Santrifuj sonrası çöken kısım %20 lik TCA ile yeniden yıkandı. Daha sonra supernatant pH'ı NaOH ile 8'e ayarlarlanarak 412 nm de absorbansları okundu. Örnek ve ayıraç körleri yardımıyla elde edilen düzeltmeden sonra SH grup konsantrasyonları "extinction" katsayısı olarak 1,31 mM^{-1} mm^{-1} değeri kullanılarak hesaplandı.

2.8. İstatistiksel Analizler

Tüm deney sonuçları ortalama±SEM olarak verilmiştir. Tüm parametreler ANOVA testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. ANOVA testi sonrasında farklı olan grupları belirlemek amacıyla TUKEY post-hoc testi kullanılmıştır. İstatiksel anlamlılık test değeri olarak 0.01 değeri seçilmiştir.

2.9. Kullanılan Kimyasallar

NaCl, KCl, $MgSO_4$, $CaCl_2$, KH_2PO4, HEPES, glucose, CsCl, $MgC1_2$, MgATP, EGTA, Na_2GTP, $CdCl_2$, Na_2HPO_4, NaH_2PO_4 ve BIM Sigma (SIGMA-ALDRICH Chemie

GmbH, Taufkirchen, Germany)'dan satın alınmıştır. Collagenase A Roche firmasından (Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Germany), FURA-2 (pentapotasyum) ise Molecular Probes (Molecular Probes, USA)'tan satın alınmıştır. Candesartan AstraZeneca (Mölndal, Sweden) firması tarafından hediye edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Hayvanların Genel Durumları

Deneyler ortalama yaşları 2,5–3 aylık ve ağırlıkları 200-250 g olan yetişkin erkek sıçanlar kullanılmıştır. Tablo 1'de görüldüğü gibi başlangıçta tüm deney gruplarının ağırlıkları ve kan şekeri düzeyleri birbirlerine yakın düzeyde iken, birinci haftadan itibaren diyabetli grupların kilo kazanımında bir duraklama olduğu (deney süreci sonunda kilo kaybettikleri) ve kan şekeri düzeylerinin kontrol grubuna göre 3–4 kat yüksek kaldığı (STZ enjeksiyonunu takiben ilk haftadaki değer seyivesinde) gözlenmiştir. Deney sürecinin sonunda diyabetik grupta ağırlıkların kontrole göre anlamlı derecede düşük olduğu, kan şekerlerindeki yükselmenin de yine istatistiksel olarak anlamlı derece de yüksek olduğu görülmektedir.

Kontrol gruplarında deney süresi boyunca ağırlıklarda düzenli bir artış olduğu, kan şekeri değerlerinin ise değişmediği görülmektedir. Diyabet grubunda ise ağırlık artışının durduğu ve kan şekeri düzeyinin kontrollere göre 4 kat artış olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Hayvanların genel parametreleri.

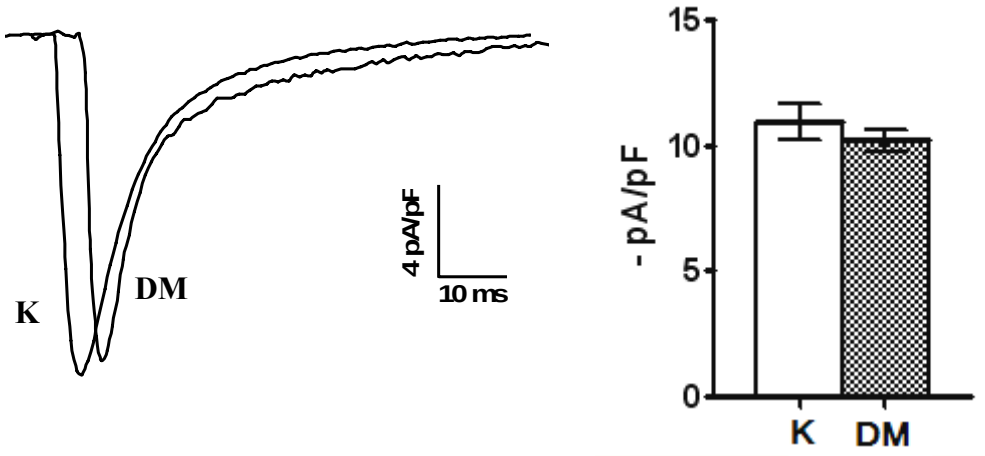
	Vücut Ağırlığı (g)		**Kan Şekeri (mg/dl)**	
	Başlangıç	**Son**	**Başlangıç**	**Son**
K (n=10)	215,2±8,6	237,1±6,8	101,5±1,8	103,4±2,6
DM (n=19)	220,2±4,8	196,1±9,6*	446,5±17,7*	431,1±8,5*

Kısaltmalar kontrol (K), Diyabet (DM) olarak kullanılmıştır. Grupların deney sürecinin başlangıcında (STZ enjeksiyonunu takiben ilk hafta) ve sonunda ölçülen ağırlıkları (g) ve kan şekeri düzeyleri (mg/dl) verilmiştir. Değerler ortalama±SEM olarak verilmiştir. n= hayvan sayısı; *p<0,01.

3.2. Deneysel Diyabetin Hücreiçi Ca^{2+} Homeostazına ve Ryanodin Reseptörlerine Etkisi

3.2.1 Diyabette L-Tipi Ca^{2+} Akımı ve Hücre İçi Serbest Ca^{2+} Derişimi

Normal ve diyabetik sıçanlardan izole edilen kardiomyositlerden voltaj kenetleme tekniği ile L-tipi Ca^{2+} kanal akımları (I_{CaL}) kayıt edilmiştir. L-tipi Ca^{2+} kanalları hücre içi Ca^{2+} homeostazında da önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle, kontrol ve diyabetli sıçan kardiyomiyositlerinden kaydedilen Ca^{2+} akımları hücre sığasına oranlanarak akım yoğunlukları belirlenmiştir. Bu akımların değerlendirilmesinden elde edilen ortalama akım yoğunluğunun zar potansiyeline göre değişim eğrileri ve gruplara ait örnek akım kayıtları Şekil 3.1 de görülmektedir. Sonuçlara bakıldığında, K ve DM gruplarının akım yoğunlukları (10,9 ± 0,7 pA/pF; 10,2 ± 0,5 pA/pF) arasında bir fark olmadığı, dolayısıyla diyabetin kardiyak I_{CaL} akımlarını etkilemediği görülmektedir. Akım yoğunluğu genlikleri yanında 2 parametreli eksponansiyel eğri uydurularak elde edilen hızlı ve yavaş zaman sabitleri de yakın bulunmuştur (K; 8,1 ± 1,2, 52,9 ± 7,1: DM; 7,6 ± 1,9 ms; 54,9 ± 5,8 ms).



Şekil 3.1. L-tipi kalsiyum kanal akımları. *Solda*, K ve DM gruplarına ait örnek I_{CaL} kayıtları (0 mV); *Sağda,* 0 mV'da ölçülen akım yoğunlukları ortalamasından elde edilen değerleri gösteren grafik. Değerler ortalama ± standart hata ile temsil edilmiştir.

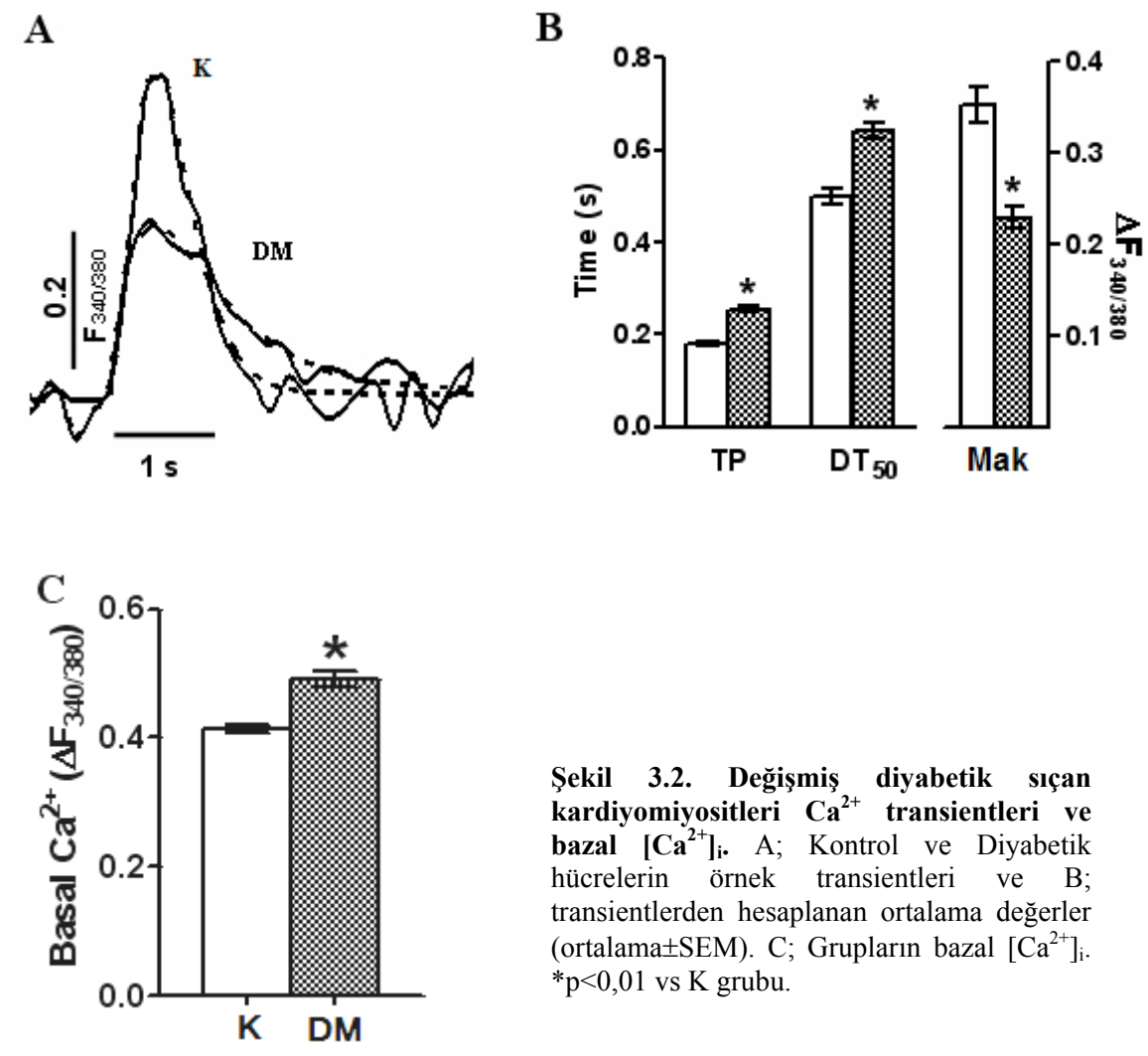
Bu kanalların akım-voltaj karaktersitikleri (-80 mV dan +60 mV kadar 10'ar mV luk artan voltaj değerlerinde) voltaj kenetlemesi altında incelendiğinde kontrol grubu ile diyabetli grubun değişim eğrilerinin üst üste çakıştığı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı gözlenmiştir. Kısaca bu bulgular, diyabetin, I_{CaL}'lerin ne tepe değerlerini ne de voltaj karaktristiklerini etkilemediğini göstermiştir (Şekil. 3.1)

3.2.2 Diyabetik Kardiyomiyositlerde Hücre İçi Serbest Ca^{2+} Derişimi

Kardiyomiyositlerde $[Ca^{2+}]_i$ değişimi hem kalbin mekanik aktivitesini düzenleyen mekanizmalarda ve hem de hücre içi ikincil mesajcı yolağında çok önemli rollere sahiptir. Böylece, bu derişimdeki değişimlerin incelenmesi kasılma ve hücre içi sinyal iletimi ile ilgili bilgi birikimini artırmakte ve bu sistemlerle ilgili problem çözümünü kolaylaştırmaktadır. Bilindiği gibi, kardiyomiyositlerin kasılabilmesi için $[Ca^{2+}]_i$ değişiminin dinlemine göre 10–100 kat artması gerekir ki bu artışta önemli miktarda Ca^{2+} hücre içi depolardan (SR) salınır. Bu salınımın gerçekleşebilmesi ise hücre dışından Ca^{2+}'un hüçre içine girmesi ile olur (CICR). İşte SR'dan salınan ve geçici Ca^{2+} değişimleri (Ca^{2+} transient) adı verilen bu değişimlerin gözlenmesi hem hücredeki bazal $[Ca^{2+}]_i$ seviyesi hakkında uyarı sonrası $[Ca^{2+}]_i$ 'nin değişim kinetikleri hakkında ve böylese SR' nin yapısı ve fonksiyonu hakkında bilgi verir.

Her hücre için gözlenen Ca^{2+} sinyalleri (transient) Excel ortamında tek tek gama fonksiyonuna uydurulup bu sinyallerin değişimleri ile ilgili çeşitli parametreleri (Mak, TP, DT_{50}) ölçülmüş ve hücre bu süre boyunca kaydedilen Ca^{2+}-transientlerinin değerlerinin ortalaması değerlendirilmiştir. Elektrik alan uyarısı ile uyarılan kardiyomiyositlerden kaydedilen floresan (Fura-2) değişim eğrileri Şekil 3.2 A' de görülmektedir. $[Ca^{2+}]_i$ artışına karşılık denk gelen floresan şiddeti değişmlerinin tepe değerlerinin zamansal özelliklerinin ortalama değerleri (aritmetik ortalama ± standart hata olarak) Şekil 3.2 B' de bar-grafik olarak gösterilmiştir. Ayrıca, bu hücrelerdeki bazal $[Ca^{2+}]_i$ değerleri yine aritmetik ortalama ± standart hata olarak Şekil 3.2 C' de bar-grafik olarak gösterilmiştir.

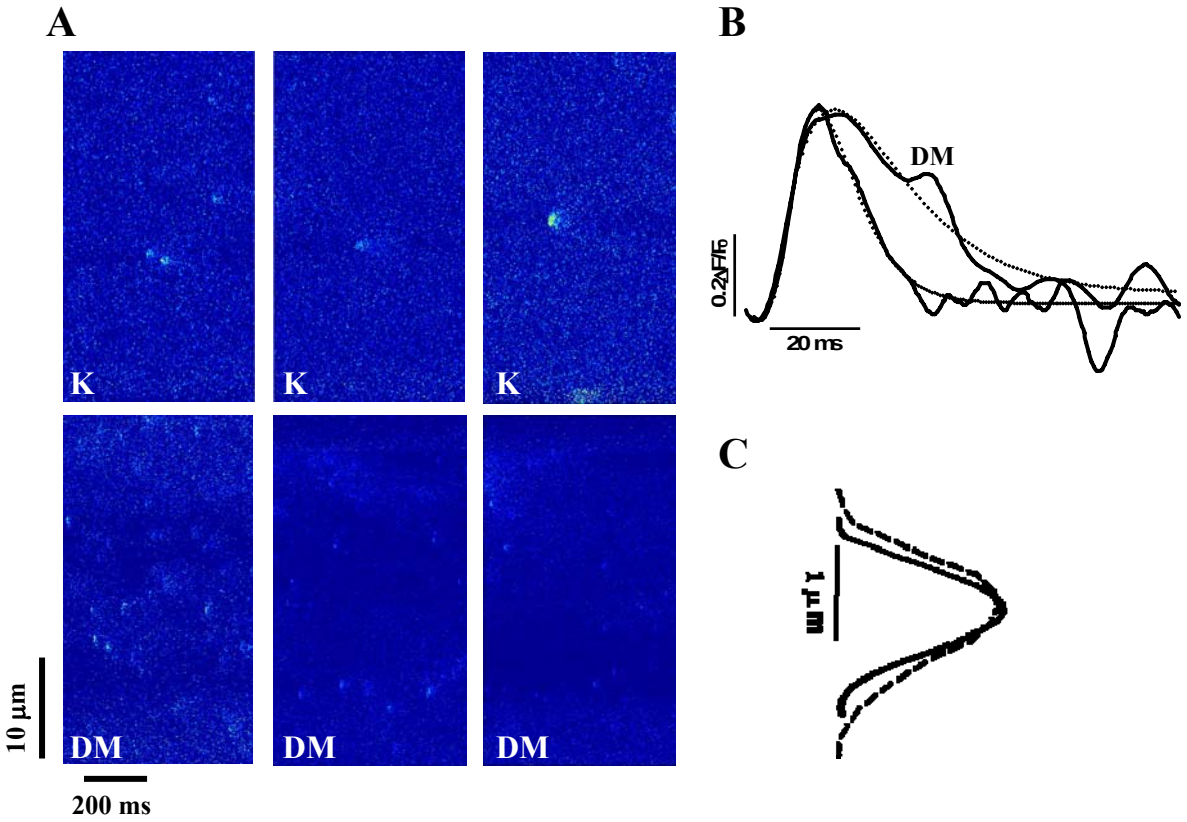
Ölçülen ortalama değerler karşılaştırıldığında, diyabetin kontrole göre Ca^{2+} transientlerinin maksium tepe değerini düşürdüğü, TP'yi ve DT_{50}'yi ise anlamlı düzeyde uzattığı, diğer yandan bazal $[Ca^{2+}]_i$ artırarak hücre içinde dinlenim durumunda hücrenin $[Ca^{2+}]_i$ ile yüklenmesine neden olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, uzun süreli diyabetin kardiyomiyositlerde, geçici $[Ca^{2+}]_i$ değişimlerinde önemli değişikliklere neden olmakta; genliklerini baskılarken, kinetik parametrelerini yavaşlatmaktadır.



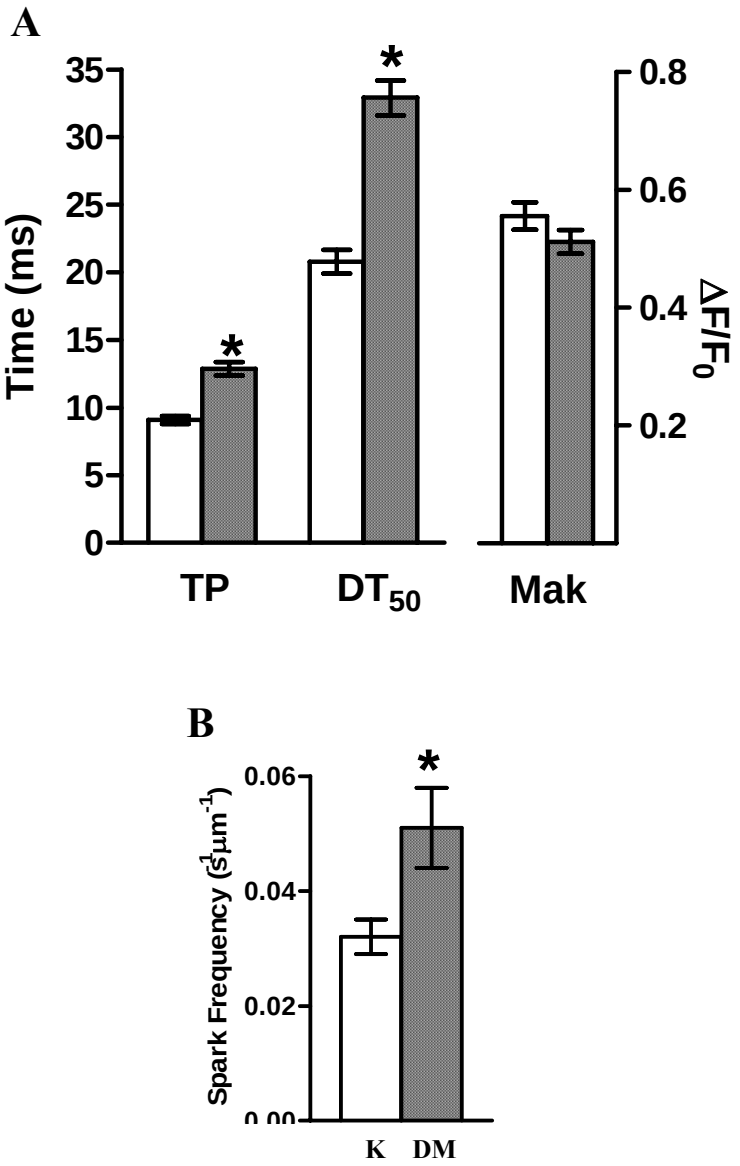
Şekil 3.2. Değişmiş diyabetik sıçan kardiyomiyositleri Ca^{2+} transientleri ve bazal $[Ca^{2+}]_i$. A; Kontrol ve Diyabetik hücrelerin örnek transientleri ve B; transientlerden hesaplanan ortalama değerler (ortalama±SEM). C; Grupların bazal $[Ca^{2+}]_i$. *p<0,01 vs K grubu.

3.2.3 Lokal Ca^{2+} Salınımı (Spark) ile İlgili Parametreler

Dinlenim durumdaki hücrelerden ölçülen sparklar, tepeye çıkış süresi (TP) ve maksimum genliğin %50 sine iniş süresi (DT50) olarak zamansal, maksimum genlik (PA) ve maksimum genliğin yarısına düştüğü genişlik (FWHM) olarak ise uzaysal özellikleri ölçülmüştür. Ayrıca lokal Ca^{2+} salınım frekansı tüm hücreden alınan görüntülerden sayılarak ölçülmüştür. Kaydedilen görüntülerden elde edilen sparkların zamansal ve uzaysal profillerden örnekler Şekil 3.3A da ve bunlara karşılık uydurulan değişim eğrileri aynı şeklin B ve C bölümlerinde görülmektedir.



Şekil 3.3. Diyabetik durumda Ca^{2+} sparklarının uzaysal ve zamansal özellikleri. A; İzole kardiyomiyositlerin doğru-tarama modunda elde edilen örnek görüntüleri. B; Görüntülerden elde edilen sparkların zamansal ve uzaysal profilleri. C; Kontrol ve Diyabetik gruplarda ölçülen sparkların TP, DT_{50} ve Mak ortalama değerleri (ortalama±SEM). D; İki grup için elde edilen sparkların genişlik (FWHM) ve frekans değerleri. *p<0,01 vs K grubu.



Şekil 3.4. Diyabetin Ca^{2+} spark parametrelerine etkisi. A; Kontrol ve Diyabetik gruplarda ölçülen sparkların TP, DT_{50} ve Mak ortalama değerleri (ortalama±SEM). B; İki grup için elde edilen sparkların genişlik (FWHM) ve frekans değerleri. *p<0,01 vs K grubu.

Ca^{2+} spark karakteristiğini aktaran sayısallaştırılmış veriler Şekil 3.4A ve B de özetlenmiştir. Diyabetik hayvanlardan elde edilen sparkların genlikleri (0,51 ± 0,02) kontrol grubuna (0,56 ± 0,02) göre değişmediği gözlenmesine rağmen tepeye ulaşma süreleri(DM; 12,88 ± 0,50 ve K; 9,08 ± 0,30 ms) ile birlikte yarıya düşüş süreleri açısından (K; 20,78 ± 0,87 ve DM; 32,90 ± 1,29 ms) diyabetli grupta önemli

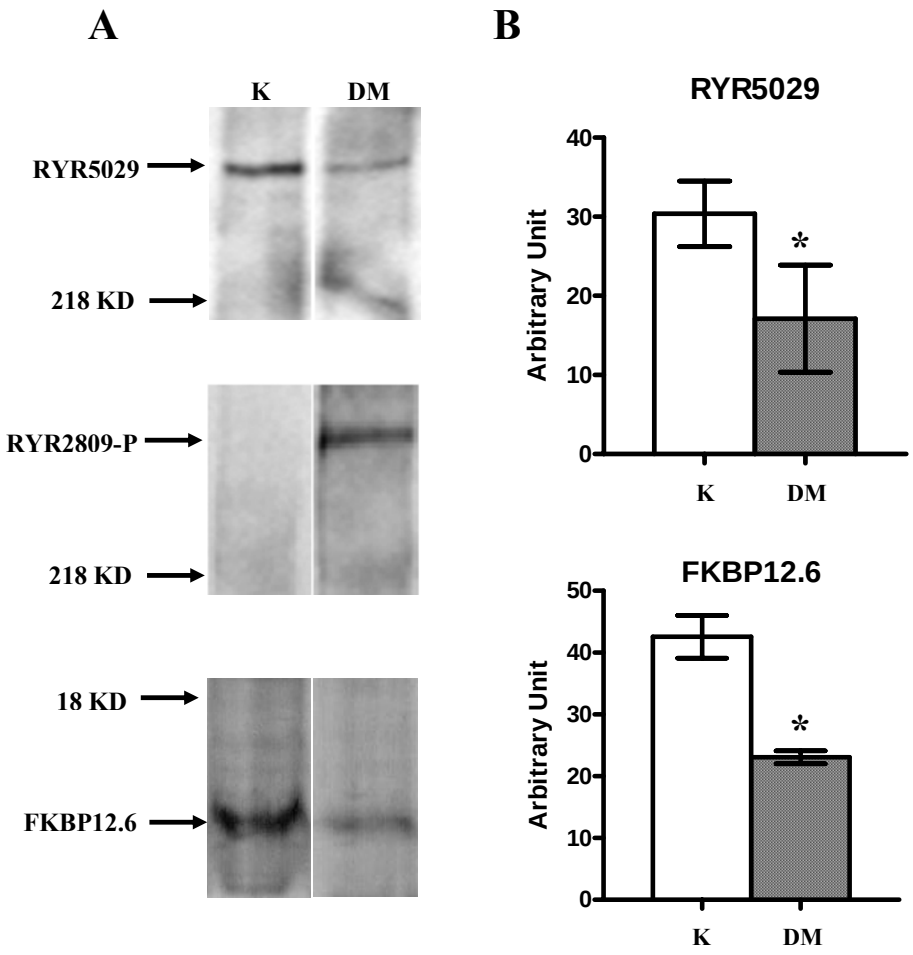
derecede uzadığı tespit edilmiştir. Spontan Ca^{2+} spark frekansı diyabetik hücrelerde (0,051 ± 0,007 s^{-1} μm^{-1}) kontrollere (0.032 ± 0.003 s^{-1} μm^{-1})göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu kayıtlar, her bir gruptan sırasıyla 5 ve 4 sıçan olup bu sıçanların her birinden ortalama 10 adet hücre ve 150 adet spark kaydı yapılmıştır.

3.2.4 RYR2 ve FKBP12.6 Protein Seviyeleri

Diyabetik kardiyomiyopatinin yol açtığı Ca^{2+} homeaostazı bozuklarında RYR2 lerde oluşan fonksiyon bozukluklarının rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Global ve lokal düzeyde Ca^{2+} salınımında oluşan bozuklukların RYR hiper-fosforilasyonu sonucu FKBP12.6 proteinin bu reseptörlerden ayrılması ile meydana geldiği düşüncesi ağırlık kazanmaktadır. Bu düşünce ile RYR2 protein ve fosforilasyon seviyesi, ayrıca FKBP12.6 protein seviyesi SR veziküllerinde ölçülerek kontrol ve diyabetik grupların verileri karşılaştırılmıştır.

Western-blot yöntemi ile tayin edilen RYR2 ve FKBP12.6 seviyeleri ortalama luminesans değerleri Şekil 3.5'de verilmiştir. Luminesan duyarlı filmler üzerinden alınan örnek bantlar grafiklerin yanında sunulmuştur.

Western-blottan elde edilen bantlar incelendiğinde, total RYR2 seviyesinin diyabetik grupta kontrol grubuna göre yaklaşık olarak % 44 oranında daha az olduğu görülmüştür (Şekil 3.3, üst). Bu bulguya paralel olarak, FKBP12.6 seviyesinin de DM grubunda yaklaşık % 41 oranında düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.5, alt).



Şekil 3.5. RYR2 protein seviyeleri ve fosforilizasyon durumu. A; Kontrol ve diyabetik sıçanlar için RYR2, RYR2-P ve FKBP12.6 örnek western blot resimleri. B; Gruplar arasında gözlenen RYR2 ve FKBP12.6 ortalama değişimleri gösteren grafikler. *p<0,01 vs K grubu.

3.3. Anjiyotensin ve Diyabet İlişkisi: AT_1 Reseptör Blokajının Hücreiçi Ca^{2+} Homeostazına Etkisi

RA sisteminin elemanlarının (renin, anjiyotensinojen, Ang I, Ang II ve ACE) dokulardaki varlığının aydınlatılması, lokal renin-anjiyotensin sisteminin kalpte ve diğer organlardaki fonksiyon bozukluklarında yer aldığı düşüncesini güçlendirmiştir (De Mello ve Danser, 2000). Ayrıca, RA sistemi aktivitesinin diyabetik koşullarda diğer organlar yanında kalpte de artığının bildirilmesi (Fiordaliso ve ark., 2000) Ca^{2+} homeostazında görülen bozukluklardan bu sistemin sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

Bu düşünceyle, diyabetik kardiyomiyositlerde yukarda sunulan fonksiyon bozukluklarının altında yatan mekanizma olarak diyabetik koşullarda kalpte artmış olan anjiyotensin aktivitesinin rolünü araştırmak üzere AT1 blokörü Candesartan ve olası katkıda bulunabileceği hipotez edilen (diyabetli sıçan kalbinde PKC'nin aktive olması gibi) PKC blokörü BIM kullanılarak, diyabetli sıçan kariyomiyositlerinde bir önceki bölümde Ca^{2+} homeostazında rol alan mekanizmalar ve ilişkili parametreler ölçülmüştür.

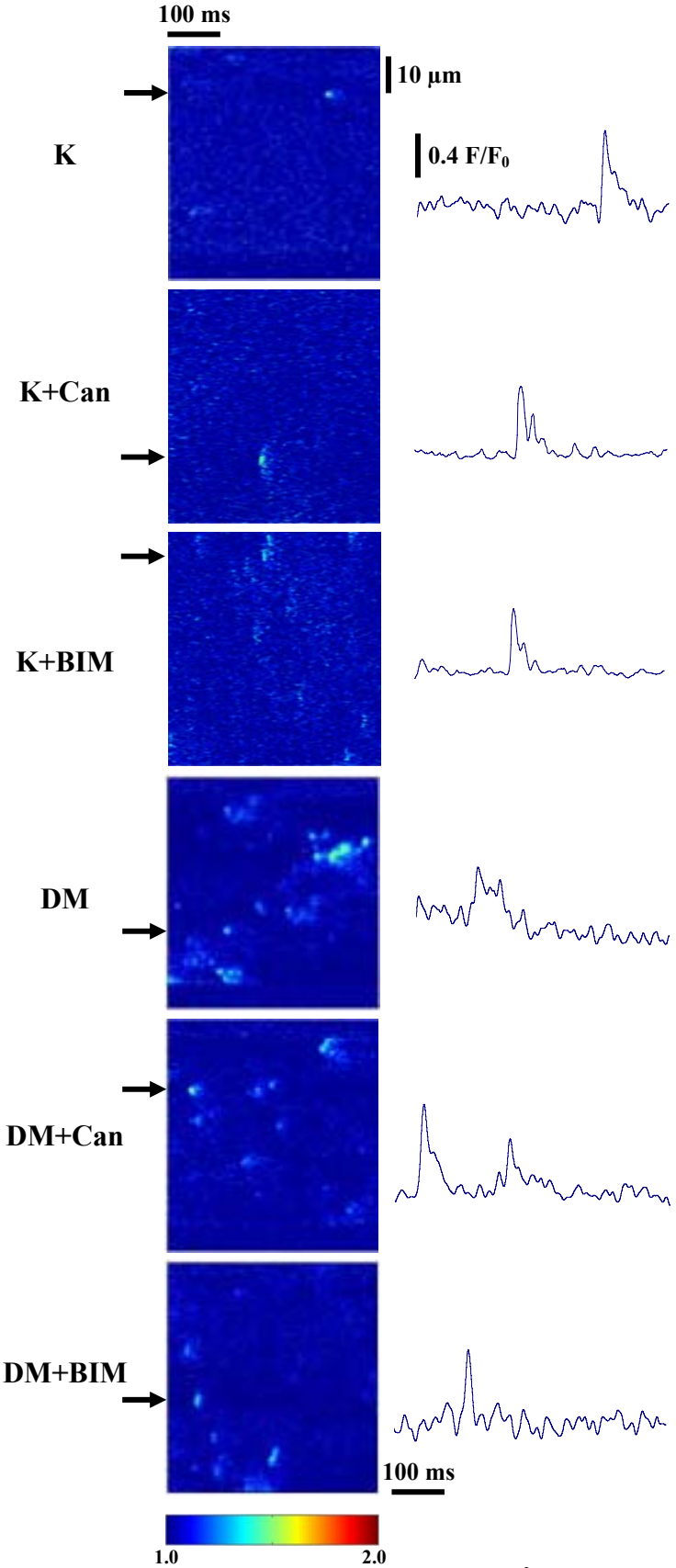
3.3.1 Lokal Ca^{2+} Salınımı (Spark) ile İlgili Parametreler

Kontrol ve diyabetik sıçan hücrelerinden ve bu hücrelerin candesartan ve BIM inkübasyonu sonrası kaydedilen sparklar ve bu sparkların uzaysal-zamansal profil örnekleri Şekil 3.6 da sunulmuştur. Bu verilerin analizi sonucu, diyabetli hayvanların kardiyomiyositlerinden (DM) alınan spark kayıtlarında TP değerlerinin kontrol hayvanlarına (K 9,08 ± 0,30 ms; DM 12,88 ± 0,50 ms) göre anlamlı derecede uzun olduğu görülmüştür (Şekil 3.7-A). Bu parametreye paralel olarak, spark kayıtlarında DT_{50} parametresinin de diyabetli grupda (DM 32,90 ± 1,29 ms) kontrol grubuna (K 20,78 ± 0,87 ms) göre istatiksel olarak uzun olduğu gözlenmiştir. (Şekil 3.7-B). Bu verilerden anlaşıldığı gibi STZ ile oluşturulan diyabet model kardiyomiyositlerde lokal Ca^{2+} salınımı zamansal özellikleri uzayarak daha uzun süre hüçre içine Ca^{2+} salınımı gerçekleşmektedir.

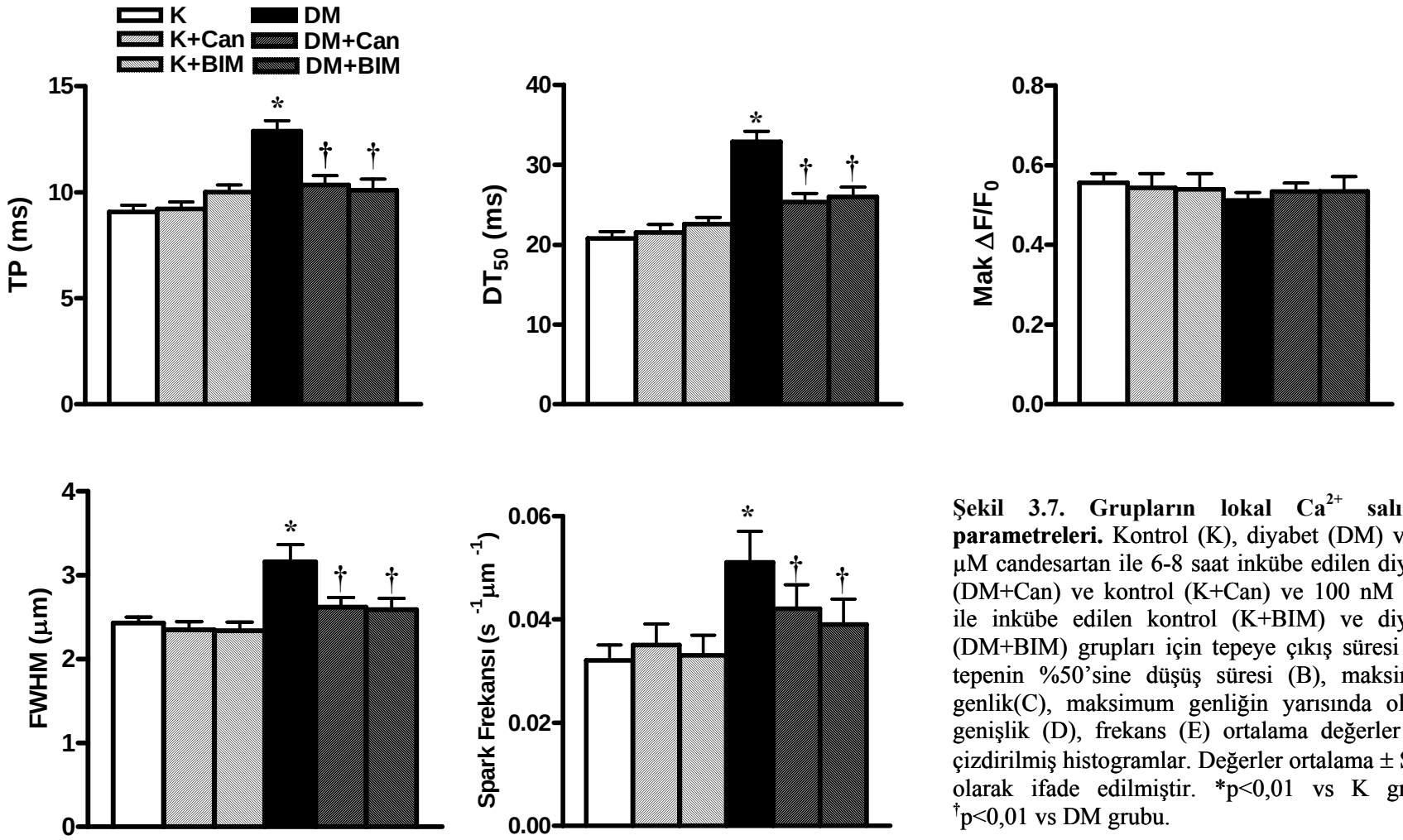
Diyabetik hayvanların kardiyomiyositlerinde gözlenen bu uzamanın hücrelerin candesartan ve BIM inkubasyonu sonrası kısalarak kontrol değerlerine yaklaştığı Şekil 3.7.A-B de görülmektedir (D+Can 10,35 ± 0,43 ms; D+BIM 10,10 ± 0,51 ms). Buna karşın K grubu hücrelerinde candesartan ve BIM inkübasyonun TP ve DT_{50} parametrelerinde bir etki yaratmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar kısaca, diyabetde ortaya çıkan Ca^{2+} salınımı bozukluklarında AngII'nin ve PKC aktivasyonunun önemli rolü olduğunu ortaya koymaktadır.

Lokal Ca^{2+} salınımlarının maksimum genlikleri incelendiğinde (Şekil 3.7-C), diyabet oluşturulan sıçan kardiyomiyositlerinde gözlenen Ca^{2+} sparkların tepe değerlerinde kontrol grubu hücrelerine kıyasla bir fark oluşturmamıştır (K 0,556 ± 0,023; DM 0,512 ± 0,020). Diğer yandan, candesartan veya BIM ile bu hücrelerin inkibasyonunun ne kontrol grubunda ne de diyabetli grupta sparkların maksimum genlikleri üzerine istatiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmamıştır. Ortalama değerler sırasıyla; K+Can grubunda 0,543 ± 0,035, DM+Can grubunda 0,534 ± 0,021, K+BIM grubunma 0,540 ± 0,040, DM+BIM grubun da 0,534 ± 0,037 olarak ölçülmüştür (Şekil 3.7-C).

Spark tepe değerinin yarısında oluşan uzaysal genliği veren FWHM parametresini (Şekil 3.7-C) incelendiğinde DM grubu hücrelerin (3,16 ± 0,20 μm) K grubu hücrelerinden (2,43 ± 0,07 μm) daha geniş Ca^{2+} salınımı oluşturdukları gözlenmiştir. Kontrol hücrelerinin candesartan (K+Can 2,35 ± 0,10) ve BIM (K+BIM 2,34 ± 0,10) ile inkübasyonu sonucu FWHM'larında K grubu hücrelerine göre bir fark oluşmamasına karşın, diyabetli grup hücrelerin inkubasyonla istatiksel olarak önemli bir derecede DM grubu hücrelerine göre genişlikleri azalmış ve K grubu hücrelerin değerlerine yaklaştığı Şekil 3.7.D görülmektedir (DM+Can 2,62 ± 0,12: DM+BIM 2,59 ± 0,13).



Şekil 3.6. Kardiyak hücrelerden kaydedilen örnek Ca^{2+} spark görüntüleri. Kontrol (K), diyabet (DM),candesartan (1 µM) ve BIM (10 µM) ile inkübe edilen K ve DM grubu hücreleri (sırasıyla K+Can, K+BIM, DM+Can ve DM+BIM) için örnek ΔF/F resimleri (sol kolon) ve zaman profilleri(sağ kolon).



Şekil 3.7. Grupların lokal Ca^{2+} salınımı parametreleri. Kontrol (K), diyabet (DM) ve 10 μM candesartan ile 6-8 saat inkübe edilen diyabet (DM+Can) ve kontrol (K+Can) ve 100 nM BIM ile inkübe edilen kontrol (K+BIM) ve diyabet (DM+BIM) grupları için tepeye çıkış süresi (A), tepenin %50'sine düşüş süresi (B), maksimum genlik(C), maksimum genliğin yarısında oluşan genişlik (D), frekans (E) ortalama değerler için çizdirilmiş histogramlar. Değerler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. *p<0,01 vs K grubu, †p<0,01 vs DM grubu.

3.3.2 Diyabetik Kardiyomiyositlerde Uyarılma-Kasılma Kazanç Faktörü

Uyarılma-kasılma çiftleniminde önemli role sahip CICR mekanizmasında diyabet gibi çeşitli patolojik durumların oluşturduğu değişimleri gözlemek amacıyla simultane olarak, hücre içine giren Ca^{2+} (I_{CaL}) ile ve hücre içinde artan Ca^{2+} miktarını (geçici $[Ca^{2+}]_i$ değişimi) ölçümü yapılabilmekte ve bu değerlerden uyarılma-kasılma kazanç faktörü adı verilen bir parametreye ulaşılabilmektedir. Deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlardan gözlenen hücreiçi Ca^{2+} düzenlenmesinde oluşan bozukluklarında angiotensin sinyal yolağının rolünü incelemek için kardiyomiyositler AT_1 blokörü candesartan ve PKC inhibitörü BIM ile inkübe edilerek I_{CaL} ile eşzamanlı $[Ca]_i$ ölçümleri yapılmıştır.

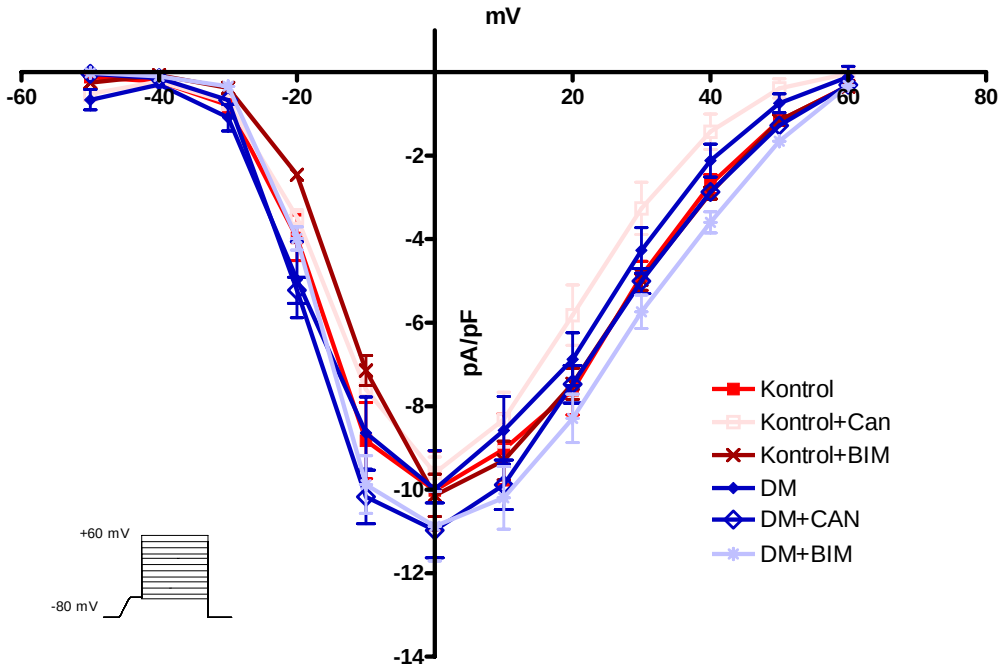
L-Tipi Ca^{2+} Akımı ile İlgili Bulgular

Kardiyomiyositlerde, I_{CaL}'nın AP'nin özelliklerini etkilemesinin yanında, hücre içi Ca^{2+} homeostazında ve dolayısıyla kasılmada önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle, kontrol ve diyabetli sıçan ventrikül miyositlerinden kaydedilen I_{CaL} yoğunlukları candesartan ve BIM inkubasyonu yapılarak ölçüldü ve kinetik analizleri yapıldı. Bu akımların değerlendirilmesinden elde edilen ortalama akım yoğunluğunun zar potansiyeline göre değişim eğrileri ve gruplara ait örnek akım kayıtları Şekil 3.8 ve Şekil 3.9 de görülmektedir.

Sonuçlar incelendiğinde, K ve DM gruplarının akım yoğunluğu tepe değerleri (sırasıyla -10,98 ± 0,94 pA/pF; -9,99 ± 0,92 pA/pF) arasında bir fark olmadığı görülmektedir. Grafik bütün olarak incelendiğinde, bu gruplar arasında kenetlenen tüm voltajlarda (-50 - +60 arası) akım yoğunluklarının değişmediği dolayısıyla diyabetin kardiyak I_{CaL}'nı etkilemediği gözlenmiştir.

Şekil 3.8 incelendiğinde, öncelikle kontrol grubundan kardiyomiyositlerin candesartan veya BIM ile inkübe edilmelerinin I_{CaL} yoğunluklarını (tepe değer olarak akımların 0 mV' daki değerleri alınarak) inkübe edilmeyenlerle karşılaştırıldığında

istatiksel olarak anlamlı düzeyde değiştirmediği (K+Can: -9.60 ± 0.39 pA/pF, K+BIM: -10.13 ± 0.51 pA/pF, K: (-10.01 ± 0.94 pA/pF) görülmektedir. Bu sonuç, her iki maddeninde kardiak akım yoğunluklarını etkilemediğini göstermiştir. Benzer şekilde, diyabetik sıçan ventrikül myositlerinin I_{CaL} yoğunlukları da candesartan veya BIM ile inkübe edilmeleri sonucu yine edilmeyenlerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p>0.05$) farklı olmadıkları görülmüştür (DM+Can: -10.97 ± 0.66 pA/pF, DM+BIM: -10.87 ± 0.83 pA/pF, DM: -9,99 ± 0,92 pA/pF).



Şekil 3.8. L-tipi kalsiyum kanal akım yoğunlukları. Zar potansiyeline göre ölçülen akım yoğunluklarının ortalamasından elde edilen değerlerin değişimini gösteren grafik ve akımın kayıt protokolü. Değerler ortalama ± SEM ile temsil edilmiştir.

Şekil 3.8 bütün olarak ele alındığında akım yoğunluğu profili hücrenin kenetlendiği bütün potansiyellerde akımın tepe değerinin değerlendirmesine benzer görüntü ortaya koymuştur. Sonuç olarak, candesartan veya BIM uygulaması ne K ne de DM grubunda I_{CaL} yoğunluğu üzerine anlamlı düzeyde etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca, tekrar vurgulanması gereklidir ki, daha önceki deneylerimizde kullanmış olduğumuz diyabet modeli I_{CaL} yoğunluğunu anlamlı düzeyde etkilememiştir.

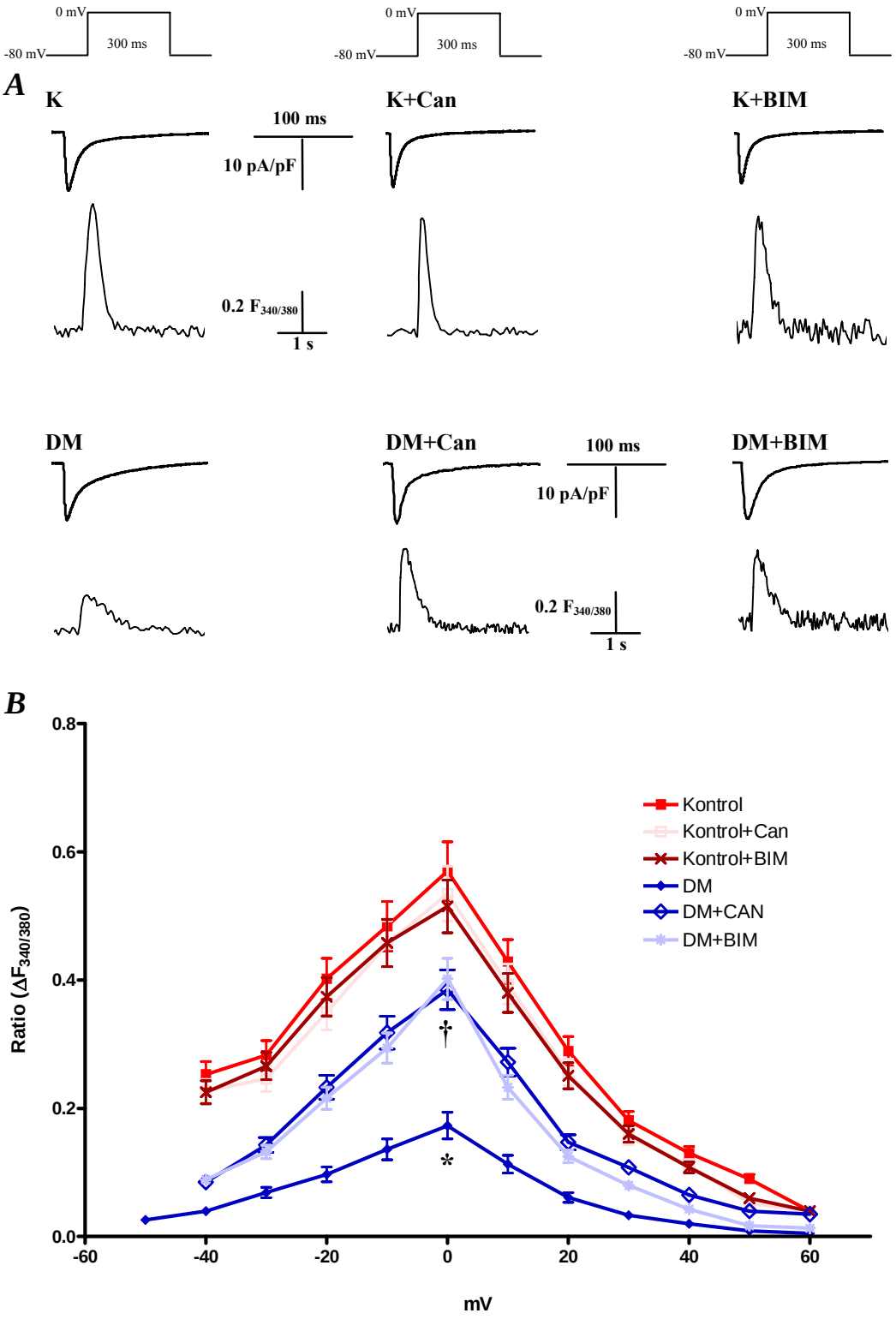
Hücre İçi Serbest Ca^{2+} Derişimi ile İlgili Bulgular

Voltaj kenetleme yönteminin tüm-hücre konfügürasyonu altında uyarılan kardiyomiyositlerden kaydedilen floresan şiddetlerinin zar potansiyeline göre değişim eğrileri Şekil 3.9.A da görülmektedir. Geçici $[Ca^{2+}]_i$ değişimine karşılık olan floresan şiddettindeki değişimler ile bu değişimlerin zamansal özelliklerini veren ortalama değerler (bar-grafik olarak) Şekil 3.9.B de gösterilmiştir.

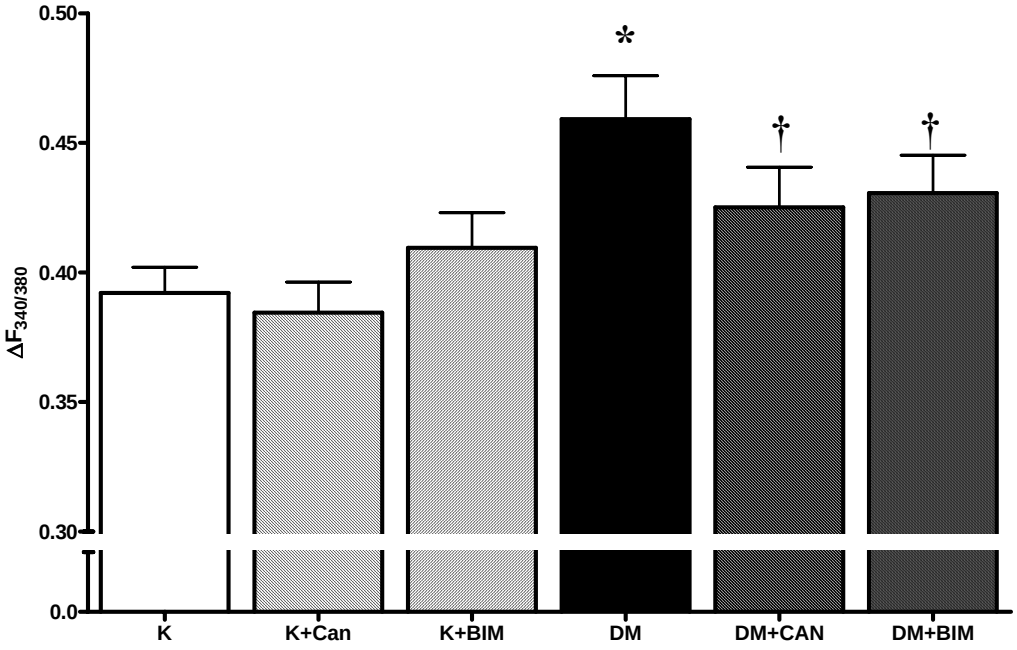
Ölçülen ortalama değerler karşılaştırıldığında, maksimum akımın ve maksimum floresan değerinin gözlendiği 0 mV da, DM grubu sıçanlarından izole edilen kardiyomiyositlerin floresan şiddeti (0.17 ± 0.02 $\Delta F_{340/380}$), kontrol grubuna (0.57 ± 0.05) göre çok düşük olduğu gözlenmiştir ($p<0,0001$). Geçici $[Ca]_i$ değişimlerinin zamansal özellikleri karşılaştırıldığında, diyabetin bu değişimlerin zamansal parametrelerini kontrollerle karşılaştırıldığında değiştirdiği (DM grubu için, TP: $258,74 \pm 9,54$ ms, DT_{50}: $615,49 \pm 29,66$ ms; K grubu için, TP: $160,66 \pm 4,95$ms, DT_{50}: $485,64 \pm 25,45$ ms) ve istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde uzamalara neden olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

Sonuç olarak, diyabet, I_{CaL} üzerinde bir etki göstermezken, bu akımların uyardığı Ca^{2+} transientlerin genliklerini baskılamakta ve zamansal özelliklerini uzatmaktadır.

Diyabetik sıçan kalbinde ortaya çıkan $[Ca]_i$ homeostazı bozukluklarının artan anjiyotensin aktivitesinin rolünü belirlemek üzere, diyabetli sıçan kalbinden izole edilmiş olan taze kardiyomiyositler candesartan ile 6–8 saat inkübe edildikten sonra da bu parametreler ölçülmüştür. Buna ek olarak, hücreiçi anjiyotensin sinyal sisteminin bir basamağını oluşturan PKC aktivasyonunun diyabetteki rolünü nelirlemek üzere, aktive olmuş olduğu ileri sürülen PKC'nin BIM ile blokajını sağlayarak bu sistemin kullandığı mekanizmalar da aydınlatılmaya çalışılmıştır.



Şekil 3.9. Voltaj kenetlemesi ile uyarılarak kaydedilmiş Ca^{2+} transientleri. A; 0 mV'a kenetlenen hücrelerde oluşan transient örnekleri. B; 0 mV'a kenetlenen hücrelerde oluşan transient ortalama değerleri. *p<0,01 vs K grubu, p<0,01 vs DM grubu.



Şekil 3.10. Grupların hücre içi serbest bazal Ca^{2+} seviyeleri. Dinlenim durumundaki kardiyomiyositlerinden kaydedilen sinyallerin ortalama değerleri ve standart hatalar (ortalama±SEM). *p<0,01 vs K grubu, †p<0,01 vs DM grubu.

Candesartan ve BIM inkubasyonu sonrasında elde edilen $[Ca]_i$ değişim örnek eğrileri ve analiz değerleri Şekil 3.9A da verilmiştir. Diyabetin geçici Ca^{2+} değişimleri üzerinde oluşturduğu olumsuz etkilerin candesartan uygulaması ile kontrol değerlerine yaklaştığı gözlenmiştir (Şekil 3.9B). DM+Can grubu (0.38 ± 0.03 $\Delta F_{340/380}$) transientlerin hüçre zarının 0 mV kenetlenmesi halinde maksimum genlikleri DM grubuna (0.17 ± 0.02 $\Delta F_{340/380}$) göre anlamlı derecede artmasına karşın tümüyle bir düzelme gözlenememiştir. Bu duruma paralel olarak, geçici Ca^{2+} değişimlerinin kinetik analizi sonuçu zamansal özelliklerde diyabetin oluşturduğu uzamayı (DM: TP 258,75 ± 9,54 ms, DT_{50} 615,49 ± 29,66) candesartan inkübasyonun (DM+Can: TP 182,26 ± 7,03, DT_{50} 562,57 ± 25,87) kısaltmış oduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.8). Voltaj kenetleme yöntemi ile –50 ile 60 mV arasına kenetlenen hücrelerin tüm kenetleme potansiyellerde diyabet ile baskılanan ve uzayan parametreler candesartan inkubasyonu ile kısmi olarak kontrol seviyesine geri çevrilmiştir.

Ayrıca, diyabetik sıçan kardiyomiyositleri bir PKC inhibitörü olan BIM ile 6-8 saat inkübe edildiğinde, benzer şekilde bu geçici Ca^{2+} değişimlerinin hem genliklerinin (DM+BIM: 0.40 ± 0.03 $\Delta F_{340/380}$) ve hem de kinetik parametrelerinin (DM+BIM: TP 192,35 ± 4,58 ms, DT_{50} 582,15 ± 24,15 ms) düzeldiği ve diyabetle (DM: TP 258,74 ± 9,54 ms, DT_{50} 615,49 ± 29,66 ms) karşılaştırıldığında bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın, kontrol hücrelerine BIM uygulaması ne genlikleri ne de zamansal özellikleri etkilememiştir (Şekil 3.9B).

Dinlenim durumunda bulunan ventrikül hücrelerinden elde edilen ölçümlerin sonucunda, DM+Can (0.43 ± 0.02 $F_{340/380}$) ve DM+BIM (0.43 ± 0.01 $F_{340/380}$) gruplarında hücre içi bazal Ca^{2+} seviyesinin DM (0.46 ± 0.02 $F_{340/380}$) grubuna göre anlamlı derecede azaldığı ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,001$) (Şekil 3.10). Buna karşılık 6 saat candesartan ve BIM inkubasyonu uygulanması kontrol sıçan kardiyomiyositlerinde hücre içi serbest bazal Ca^{2+} seviyesinin K grubuna göre önemli bir değişikliğe yol açmamıştır (Şekil 3.10).

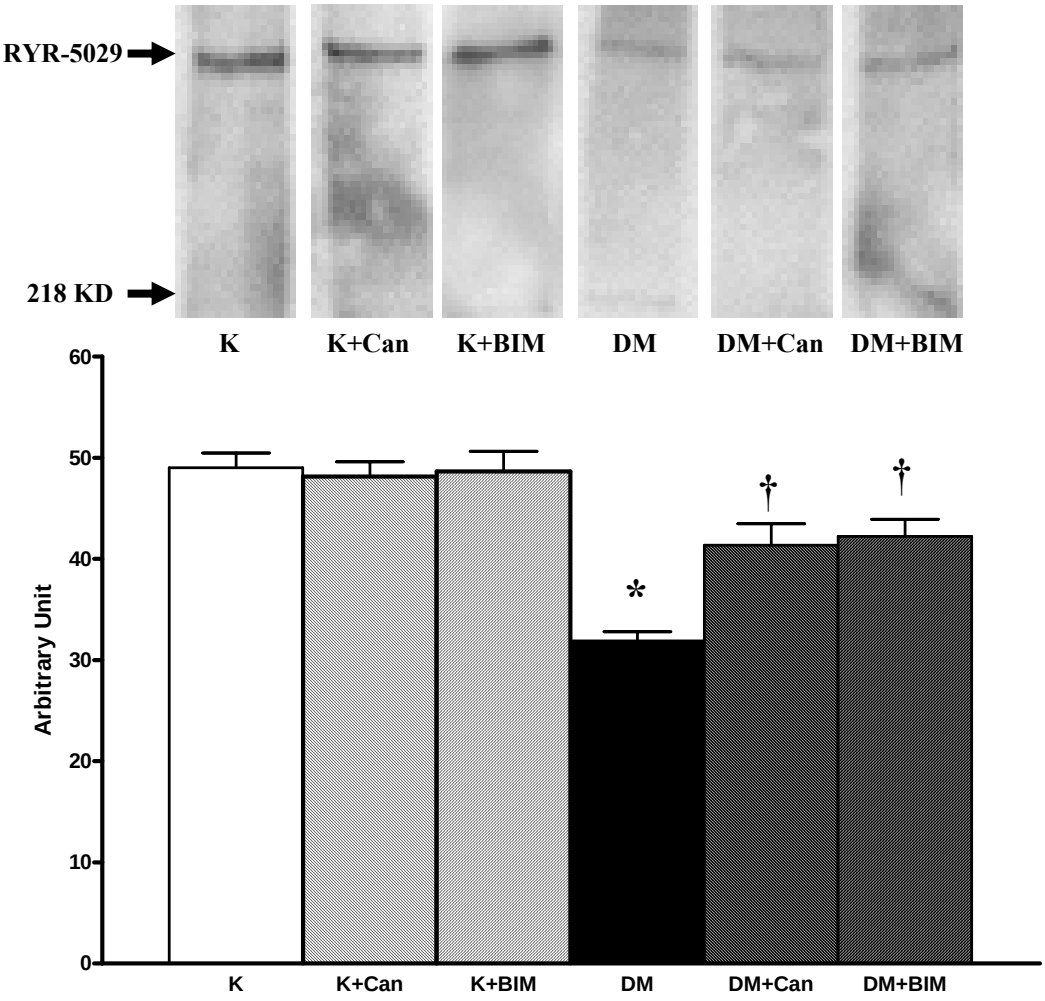
Hücreiçi serbest Ca^{2+} seviyesi ölçümleri bütün olarak ele alındığında, diyabet sonucu değişen Ca^{2+} seviyesinin candesartan ve BIM uygulaması ile kısmi olarak geri döndüğü ve geçici Ca^{2+} yanıtlarının da hem genlik hem de kinetik özelliklerinin düzeldiği sonucuna varılmıştır.

3.3.3 Western Blot Bulguları

Diyabetik kardiyomiyositlerde gözlenen RYR2 hiperfosforilasyonu, protein seviyeleri ve PKC aktivitesinin artması sonucu oluşduğu gösterilen $[Ca^{2+}]_i$ homeostazının candesartan ve BIM inkubasyonu ile geri dönmesi uygulamanın bu protein düzeyleri ve aktivitelerinin düzeldiği fikrini güçlendirmektedir. Bu düşünceyi doğrulamak için proteinlere özel olarak geliştirilmiş antikor yardımıyla proteinlerin düzeyleri ve fosforile durumları hakkında bilgi edinilmiştir.

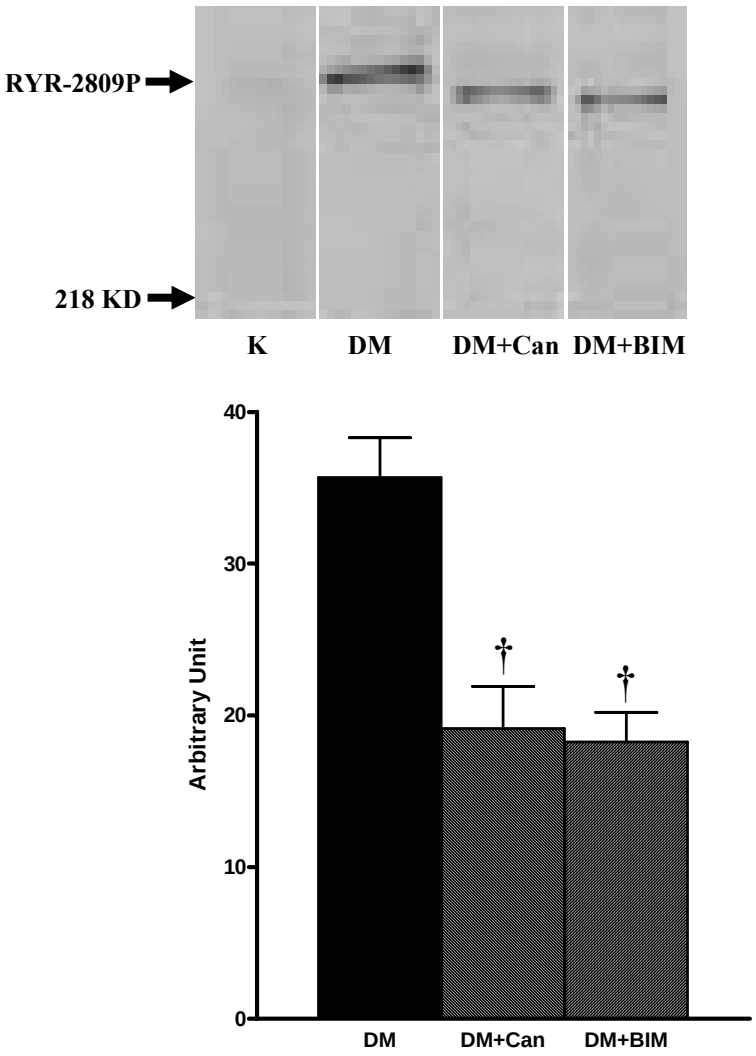
RYR2 ve FKBP12.6 Protein Seviyeleri

Hem candesartan hem de BIM inkübasyonunun toplam RYR2 protein seviyesi üzerine hem candesartan hem de BIM inkubasyonu K grubu hücrelerinde herhangi bir etki göstermezken, diyabet sonucu azalan protein seviyelerini %30 oranında düzeltmiş ve K grubu seviyesine yaklaştırmıştır (Şekil.3.11).



Şekil 3.11. Candesartan ve BIM inkubasyonunun diyabetik sıçan kalbi RYR2 üzerine etkisi. Gruplar için örnek western blot örnek resimleri ve ortalama değerlerin bar grafik gösterimleri. *p<0,01 vs K grubu, †p<0,01 vs DM grubu.

Benzer şekilde, BIM uygulaması, diyabetin etkisi sonucu azalan RYR2 protein seviyesini DM+BIM gurubu ventrikül hücrelerinde %33 oranında artırırken, K+BIM grubunda K grubuna göre bir etki göstermemiştir (Şekil3.10).

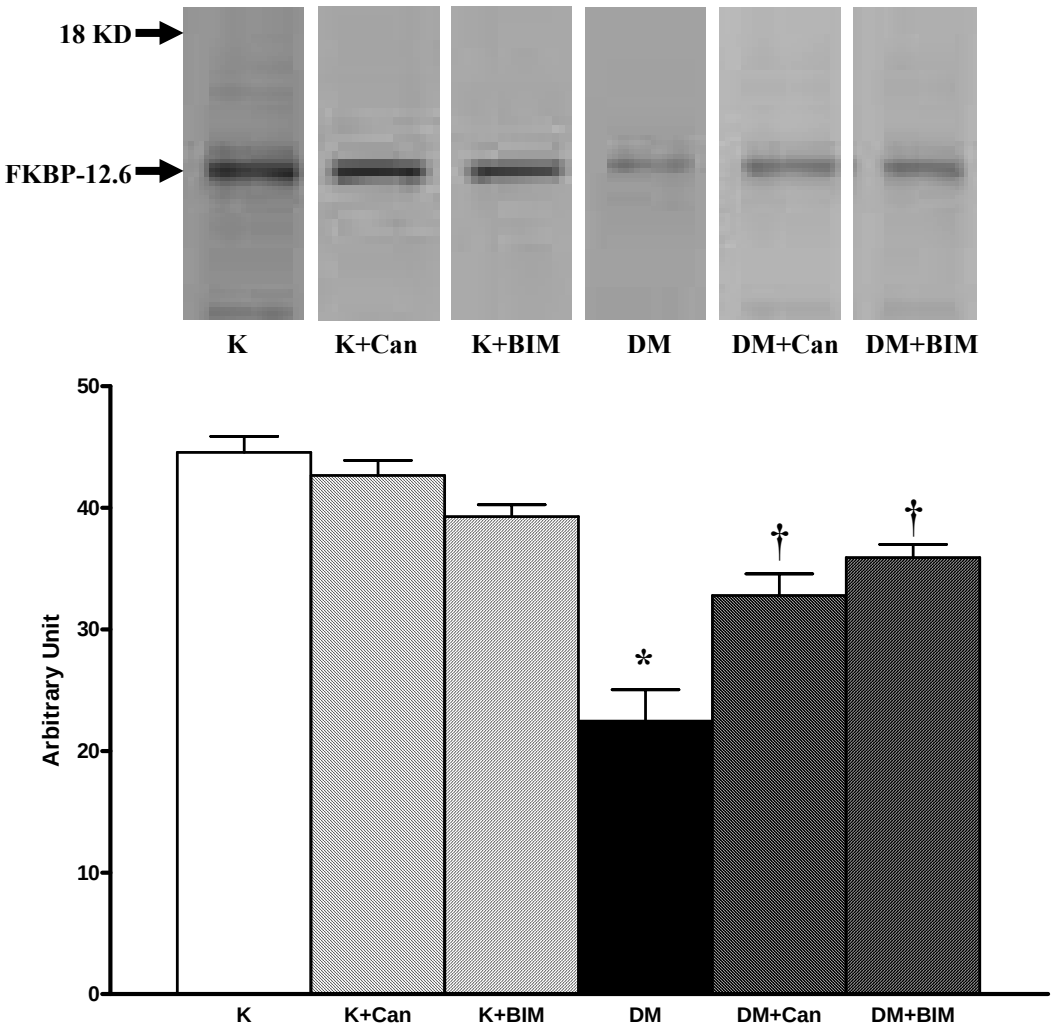


Şekil 3.12. Diyabetik sıçan kalbi RYR2 fosforilasyonu üzerine Candesartan ve BIM inkubasyonunun etkileri. Gruplar için örnek western blot örnek resimleri (A) ve ortalama±standart hata değerlerin bar grafik gösterimleri (B). Kontrol hayvanları kardiyomiyositlerinde RYR-P2809 antikorlarına karşı görüntü oluşmadığı için değerler hesaplanamamıştır. $^{\dagger}p<0,01$ vs DM grubu.

RYR2 Fosforilasyon ile İlgili Bulgular

Fosforile RYR2 için geliştirilen antikor ile yapılan western blot çalışmasında DM grubunda büyük miktarda luminesan bant gözlenmesine karşın kontrol grubunda herhangi bir aktivite bulunamamıştır (Şekil 3.12).

K grubuna paralel olarak, K+Can ve K+BIM gruplarında RYR2 fosforilasyon bandı gözlenmemiştir. Candesartan ve BIM inkubasyonun kontrol hücrelerinde fosforilasyona yol açacak bir etkisinin olmadığı Şekil 3.12 den anlaşılmaktadır



Şekil 3.13. Diyabetik sıçan kardiyomiyositlerinde Can ve BIM inkubasyonunun FKBP12.6 düzeyine etkisi. Gruplar için örnek western blot örnek resimleri (A) ve tüm deney grupları için ortalama±standart hata değerlerin bar grafik gösterimleri (B). *p<0,01 vs K grubu, †p<0,01 vs DM grubu.

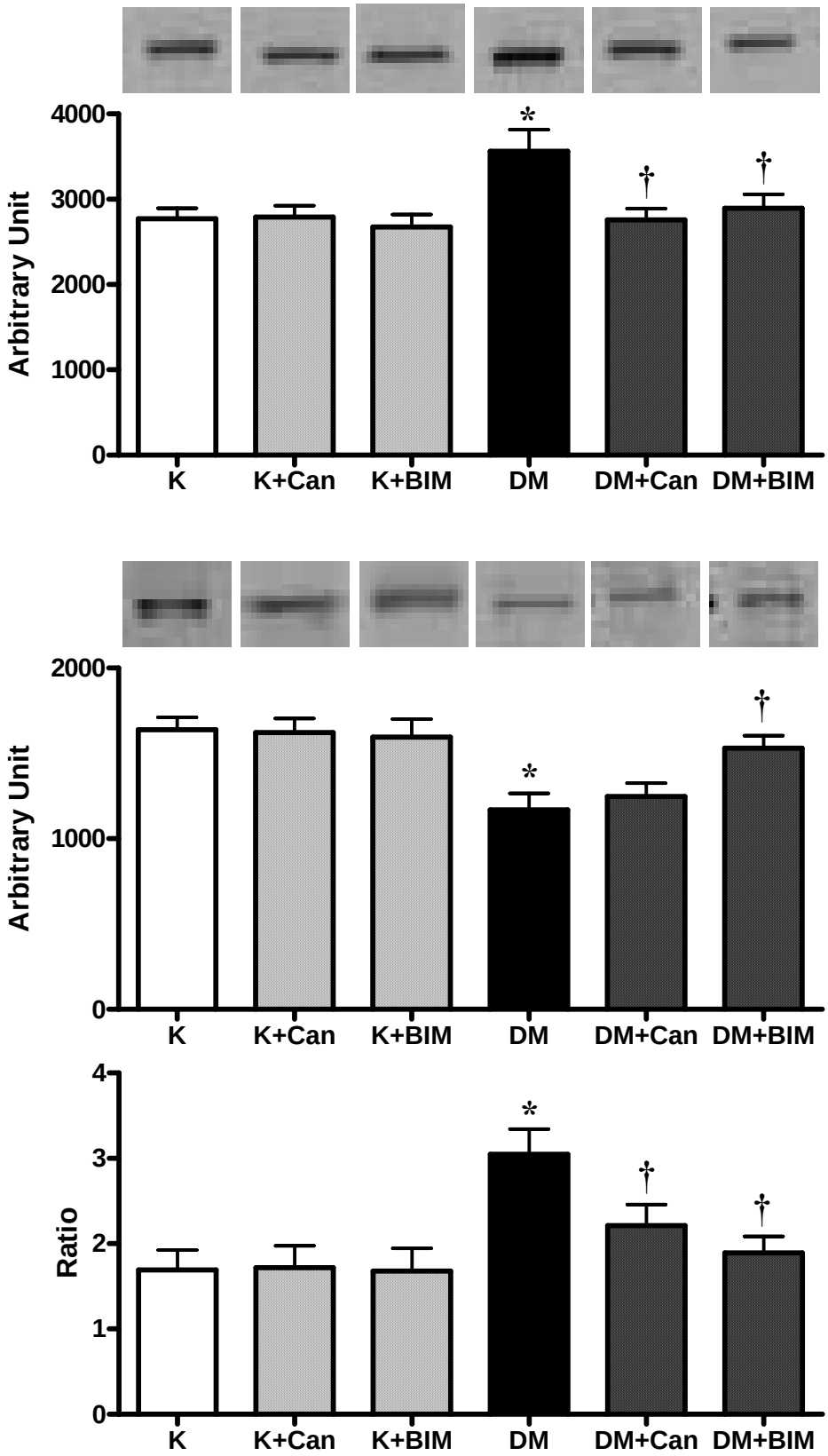
Bu bulgulara dayanarak, diyabetik durumda sıçan kardiyomiyositlerinde RYR2 ve FKBP12.6 protein seviyelerini önemli ölçüde düşdüğü ve RYR2 fosforilasyonunun ortaya çıktığı söylenebilir. Ancak, DM+Can ve DM+BIM gruplarında fosforile RYR2 bantları gözlenmesine karşın, bu bantların lumisans değerlerinin DM grubuna oranla %45-50 azaldığı gözlenmiştir.

PKC Aktivitesi Ölçümü

Diyabetik sıçanların kalp dokularında artmış olarak gözlenen PKC aktivitesinin, candesartan uygulaması sonucu azaldığı Şekil 10 da görülmektedir. Candesartan uygulaması diyabetik hücrelerde sitozolik kısımda DM grubuna göre bir değişime yol açmazken hücre zarında artan PKC seviyesini anlamlı düzeyde azalttığı gözlenmiştir. PKC aktivitesinin bir göstergesi olan sitozoli-hücrezarı protein seviyesi oranı DM+Can grubunda DM grubu hücrelerine göre azalarak K grubu seviyesine yaklaşmıştır. K grubu hücrelerinde candesartan uygulamasının protein seviyeleri ve PKC aktivitesine etkisini olmadığı gözlenmiştir.

Diğer yandan yukarıdaki western blot analizi PKC inhibitörü olan BIM ile inkübe edilmiş diyabetli kardiyomiyositlerde tekrarlandığında, inkübe edilmemiş diyabetli hücrelerle karşılaştırıldığında hücre-sitozol kısımda protein seviyesinin arttığı ve K grubu seviyesine geri döndüğü görülmektedir. Buna karşın, BIM etkisinin hücre-zarı kısmında DM grubu hücreleri PKC protein seviyesini azaltıcı yönde olduğu gözlenmiştir. Aynı grupta (DM+BIM), PKC protein seviyesi oranı (hücre-sitozol seviyesi/hücre-zarı seviyesi) olarak incelendiğinde, BIM uygulamasının bu oranı kontrol grubu hücreleri düzeyine çektiği ve bu değişikliğin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu gözlenmiştir. Ancak K+BIM grubunda ayrı ayrı bu protein seviyeleri ile protein seviyesi oranı K grubu seviyelerinde olduğu ve uygulamadan etkilenmediği Şekil 3.14'de de görülmektedir.

Diyabetin oluşturduğu komplikasyonlarda PKC aktivitesinin durumunu incelemek amacı ile sitozolik ve hücre zarı içeriğinde Western Blot yöntemi ile bu proteinin seviyeleri ölçülmüştür. Şekil 3.14'de görüleceği gibi diyabetik sıçan kalbi myositlerinde PKC seviyesi hüçre zarında artarken, sitozolik kesimde azalmıştır. Bu proteinin aktivite göstergesi olan hücrezarı total PKC protein düzeyinin sitozolik kısma oranı, DM grubunda, K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde arttığı ortaya konmuştur. Bu sonuç, diyabetin kalpde oluşturduğu komplikasyonlarda artan PKC aktivitesinin rolü olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 3.14. Normal ve Diyabetik sıçan kalp hücrelerinde Can ve BIM inkubasyonunun PKC içeriğine etkisi. Tüm grupların hücrezarı (A) ve sitozolik (B) kısımlardan elde edilen PKC içeriği ve hücrezarı/sitozolik oranı (C). Her grup için sayılaştırılan bant örnekleri grafiklerin üstlerinde gösterilmiştir. *p<0,01 vs K grubu, †p<0,01 vs DM grubu.

Bu sonuçlar, diyabetik hücrelerin candesartan ve BIM ile inkubasyonu sonucu PKC aktivitesinin kontrol hücreleri seviyesine geri döndüğü ve yukarıda tespit edilen Ca^{2+} salınımda ortaya çıkan düzelmenin PKC ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

3.3.4. Diyabetik Kardiyomiyositlerde Redoks Durumu (Thiol oksidasyonu)

Diyabetin neden olduğu metabolik bozuklukların reaktif oksijen ve nitrojen türlerin üretimin arttığı bilinmektedir (Wold ve ark., 2005). İzole kardiyomiyositlerde toplam ve serbest SH derişimi ölçülmüştür. Tablo 3.2'de özetlendiği gibi hem toplam hem de serbest SH derişimi diabetik kardiyomiyostlerde kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azalmıştır. Candesartan ve BIM inkubasyonunun kontrol grubu hücrelerinde herhangi bir etkileri gözlenmezken, diyabetik hücrelerin total ve serbest SH seviyelerini kontrol seviyesine geri dönmüştür.

Tablo 3.2: Normal ve Diabetic sıçan kalpleriden elde edilen izole kardiyomiyositlerin sulfhydryl içeriği üzerine Candesartan ve BIM etkisi.

	K	K+Can	K+BIM	DM	DM+Can	DM+BIM
Serbest SH	1,74 ± 0,02	1,81 ± 0,03	1,79 ± 0,06	0,95 ± 0,22*	1,67 ± 0,12†	1,64 ± 0,14†
Toplam SH	3,30 ± 0,46	3,84 ± 0,29	3,75 ± 0,38	1,56 ± 0,06*	2,40 ± 0,10†	2,84 ± 0,29†

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir (n=4 kalp). *$p<0,01$ vs K grubu, $^{\dagger}p<0,01$ vs DM grubu.

4. TARTIŞMA

Tip 1 diyabetin uzun süreli etkileri içinde, diyabetik kardiyomiyopati adı verilen özel bir tip kardiyomiyopatinin görüldüğü ve bunun vasküler bozukluklardan (mikro ve makro düzeylerde) bağımsız olarak ortaya çıktığı birçok diyabetli hastanın ölümüne yol açtığı bilinmektedir (Rubler ve ark, 1972). Diyabetik kardiyomiyopati diastolik ve sistolik fonksiyon bozukluklarına yol açmakta, başka bir deyişle kalp dokusunun gevşeme ve kasılma işlevlerinde anormalliklere neden olmaktadır. Diyabetik kalpte görülen bu yetmezliği yalnızca aksiyon potansiyelindeki (AP) değişiklikler ile açıklamak olası görünmemektedir. Aksiyon potansiyeli ile $[Ca^{2+}]_i$ homeostazı arasındaki ilişki kardiyomiyositlerde henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olmakla birlikte, $[Ca^{2+}]_i$'nin kasın mekanik aktivitesindeki rolü uzun zamandır bilinmektedir. Bu nedenle, diyabetin neden olduğu kasılma bozukluklarının kardiyomiyositlerin $[Ca^{2+}]_i$ homeostazında gözlenen değişikliklerle yakından ilişkili olduğu düşünülmüş ve bu düşünce uzun yıllardır deneysel bulgularla desteklenmeye çalışılmıştır (Ishikawa ve ark., 1999; Choi ve ark., 2002; Ye ve ark., 2003; Norby ve ark., 2004). Hala bu konuda çelişkili hipotezlerin ve bulguların var olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada kullanılan deney hayvanlarının genel özellikleri ve fiziksel durumları incelendiğinde, başlangıçta hem kontrol ve hem de diyabetli grup olarak ayrılan sıçanların tüm fiziksel parametreleri (ağırlıkları, yaşları ve kan şekeri düzeyleri gibi) aynı iken, deney süresi olan 6 hafta içinde diyabetli gruptaki hayvanların kilo alımında bir duraklama olduğu hatta zayıfladıkları görülmüştür. Kan şekeri düzeyleri kontrollere göre ortalama 4-kat yüksek olan bu grubun bulguları literatür bulgularıyla uyumlu olup tip 1 diyabette beklenen sonuçtur (Fein ve ark., 1980; McNeill ve ark., 1991; Ayaz ve ark., 2004).

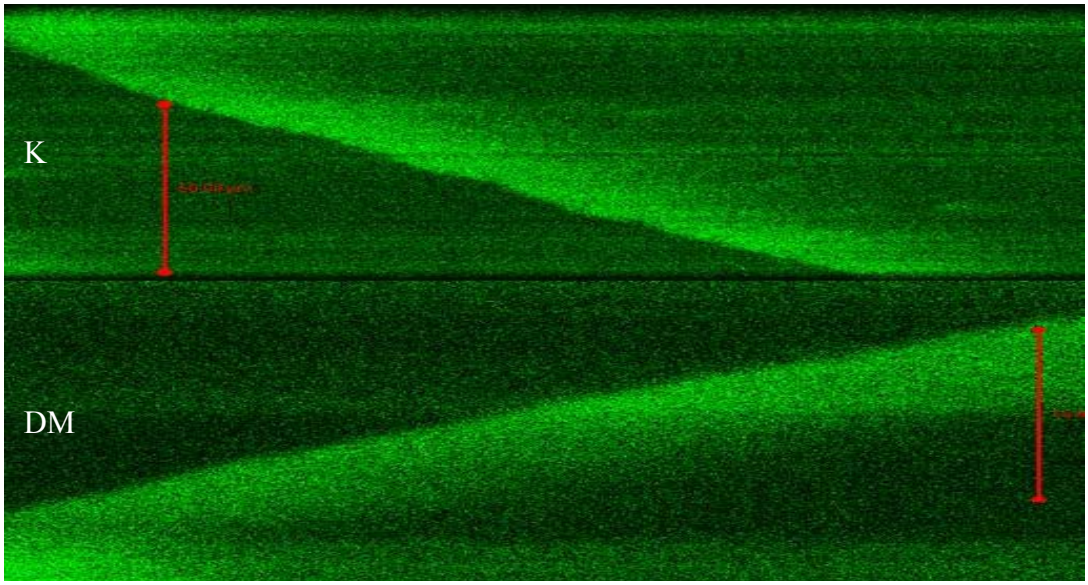
Hücre içi serbest Ca^{2+} derişimi kalp için hayati bir öneme sahip olup, normal koşullarda dinlenim durumunda sitozolde derişimi diğer hücreiçi iyonlarla karşılaştırıldığında oldukça düşüktür (yaklaşık 0.001 mM). Çünkü, hücreler için vazgeçilmez olan bu iyonun hücreiçinde uzun süreli yüksek oluşu hücredeki bazı

enzimleri harekete geçirerek hücrenin ölümüne neden olabilmektedir (Hulsmann, 1983; Viarengo ve Nicotera, 1991; Sato ve ark., 1995; Gorza ve ark., 1996; Tsuji ve ark., 2001; Matsumura ve ark., 2001). Buna karşın, Ca^{2+} hücrenin uyarılmasını takip eden kısa bir süre için geçici bir artış gösterir -ki bu kontraktil makineyi harekete geçirir- arkasından, hızla dinlenim durumu düzeyine geri düşer. Bu yüzden, $[Ca^{2+}]_i$ düzenlenmesi ve kontrol mekanizmalarının işleyişi ventrikül hücreleri için çok önemlidir. Bu nedenlerden dolayı, diyabetin $[Ca^{2+}]_i$ düzenlenmesine olan etkileri birçok çalışmaya konu olmuş ve kardiyak miyositlerin $[Ca^{2+}]_i$ seviyesini düzenleyen mekanizmalarda ciddi değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (Choi ve ark, 2002; Norby ve ark., 2004; Ye ve ark., 2003; Hayashi ve Noda, 1997; Dhalla ve ark.,1998; Pierce ve Russel,1997; Holloway ve ark., 1999).

Diyabetin I_{CaL} üzerine bir etkisinin olmadığının görülmesine karşın (Şekil 3.1), diyabetik hayvanların kalp hücrelerinin Ca^{2+} homeostazının ciddi bir değişime uğradığı görülmektedir (Şekil 3.2). Bu değişimler genel Ca^{2+} cevapları kinetiklerinde bir uzama ve genliklerinde azalma ile bazal seviyede artış olarak karşımıza çıkmaktadır. Daha önceki çalışmalarımızda (Özdemir ve ark, 2005; Ayaz ve ark 2004) görülen AP süresindeki artış ile kasılma kinetiklerinin uzamasına karşın diyabetik kardiyomiyositlerde tüm voltaj seviyelerinde Ca^{2+} akım yoğunluğu bakımında bir farkın olmadığı görülmüştür. Buradan, Ca^{2+} akımlarının geçici Ca^{2+} cevaplarında ki azalmada bir etkisinin olmadığı anlaşılmaktadır. Ancak, akımlar ile eşzamanlı kaydedilen hücreiçi Ca^{2+} derişiminin azalması uyarılma-kasılma çiftlenimi mekanizmasında, dolayısıyla hücreiçi depolardan Ca^{2+} salınımını gerçekleştiren RYR yapısında bir sorunun olduğunu göstermektedir.

Bu hipotez ile ilişkili olarak, uzun süreye ve azalmış genliğe sahip spontan Ca^{2+} salınımı bulgularımızdan (Şekil 3.2) anlaşılabileceği gibi RYR yapısında ve çalışma kinetiğinde diyabet sonucu bir sorun oluşmuştur. Bu düşünceye, spark flurosansı azalma sürecinde herhangi bir Ca^{2+} uzaklaştırıcı mekanizmanın (SERCA gibi) katılmadığı ve bu sürecin sadece Ca^{2+} difuzyonu sonucu oluştuğu varsayımı ile ulaşabilmesi mümkündür. Ancak spark azalma sürecinde hücreiçi Ca^{2+} tamponu mekanizmasının etkili olması muhtemeldir. Normal ve diyabetli sıçan

kardiyomiyositlerdeki Ca^{2+} dalgalarının yayılma hızları ve sönümlenme süreleri karşılaştırıldığında, diyabetlilerdeki Ca^{2+} dalgalarının yavaşladığı, sönümlenme zamanlarının uzadığı görülmektedir ki bu bulgular da yukarıdaki hipotezi destekleyebilecek doğrultudadır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Diyabetik durumda Ca^{2+} dalgasının zamansal özelliği. Aynı zaman eksenine sahip kontrol (K) ve diyabetli (DM) sıçan kardiyomiyositlerinde gözlenen Ca^{2+} dalgasının karşılaştırılması.

Western blot bulguları diyabette değişen RYR2 aktivitesini destekler niteliktedir. Ancak diyabette RYR2 özellikleri hakkında çelişkili bilgiler mevcuttur. Farklı iki grup tarafından benzer veriler yayınlanmıştır (Guatimosim ve ark, 2002; Bidasee ve ark, 2001). Diyabetik kardiyomiyopatide değişen Ca^{2+} sinyal mekanizmasında RYR2'nin rolünün araştırılması için spark özelliklerinin değerlendirilmesinin önemli olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca, 6 haftalık diyabetin RYR2 ekspresyonunu etkilenmemesine karşın RYR2'nin [^{3}H]ryanodine bağlama özelliğinin önemli derecede azaldığını bildirmişlerdir (Bidasee ve ark, 2001). Buna ek olarak, kronik diyabetin (8 hafta) kalp kasılmasındaki azalmanın sebebi olarak RYR2'nin ekspresyonunda azalma ve fonksiyonundaki değişim olarak gösterilmektedir (Guatimosim ve ark, 2002).

RYR2 aktivitesi, arasında FKBP12.6'nın da bulunduğu çeşitli proteinler tarafından düzenlenmektedir (Zuchhi ve Testoni, 1997; Fill ve Copello, 2002). FKBP12.6, RYR2'nin açılma kinetiğinde önemli role sahip olmasından dolayı noksanlığının ve değişimlerinin kalp yetmezliğinde rolü olduğu düşünülmektedir. Buna karşın Ca^{2+} parametreleri üzerine olan etkileri ile ilgili çelişkiler bulunmaktadır (Marx ve ark, 2000; Gomez ve ark, 2004; Xin ve ark, 2002). Deneylerimiz, Ca^{2+} sparklarının kinetik parametrelerinin diyabetik durumda kontrole oranla yavaşladığını göstermektedir. Bu değişimlerin altında yatan sorunun RYR2 reseptör davranışı kusurundan kaynaklandığı düşündürmektedir. RYR2 birleşik çalışma hipotezi ile FKBP12.6'nın RYR2 kümesinin beraber açılıp kapanmasını sağladığı (Marks , 2001) ve PKA aracılıyla RYR2'nin hiperfosforilasyonu sonucu RYR2-FKBP12.6 bağlanmasının kısmi olarak azalması ile RYR2 aktivasyon ve inaktivasyon kinetiğini etkileyerek Ca^{2+} sızıntısının arttığı ileri sürülmektedir. Bundan dolayı, bu proteinde oluşan değişiklikler, burada RYR2 protein miktarının düşmesi ile birlikte, Ca^{2+} sparklarının tepeye çıkış ve yarıya düşüş sürelerinin baskılanmasına neden olacaktır. Ancak bu durumda, RYR2 ve FKBP12.6 proteinlerindeki azalma (Şekil 3.7 ve Şekil 3.9) ve RYR2 fosforilasyonu (Şekil 3.8) spark süresini uzatırken, genlik üzerine önemli bir etkinin olmaması karşımıza soru olarak çıkmaktadır. Bu etkinin nedeni muhtemelen diyabette SR sızıntısının oluşmasıdır. Bu varsayım birçok çalışma (Choi ve ark, 2002; Belke ve Dillmann, 2004; Zhu ve ark, 2005) ve çalışmamızda bazal Ca^{2+} seviyesi ve spark frekansının diyabetik durumda artışı ile örtüşmektedir. Ancak bu durumu tam anlamı ile açıklığa kavuşturmak için RYR2 ve FKBP12.6 ilişkisini aydınlatacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmanın ikinci bölümü diyabet-kalp-renin anjiyotensin sistemi ilişkisini aydınlatmaya yoğunlaşmıştır. Diyabetin yerel RAS aktivitesini ve RAS elemanlarının miktarını arttırdığı bilinmektedir. Bir çok çalışmada, deneysel tip 1 diyabet modellerinde Ang II seviyesinin ve AT_1 reseptör yoğunluğunun arttığı ortaya konulmuştur (Sechi ve ark., 1994; Malhotra A. ve ark., 1997; Fiordaliso ve ark., 2000). Ayrıca, diyabetik sıçan kalbi PLC-DAG yolu üzerinden PKC aktivitesinin arttığı (Ishii ve ark., 1998; Shimoni, 1999; Shimoni ve Liu, 2003) ve hiperglisemik durumda bile AT_1 reseptör blokajının bu enzim aktivitesini normale çevirdiği

gösterilmiştir (Malhorta ve ark., 1997; Malhorta ve ark., 2001). Bunlara ek olarak, Shimoni (2001), hem AT_1 reseptör blokörü olan valsartan'ın hem de ACE inhibitörü olan quinapril'in diyabetik kardiyomiyositlerde azalmış olan K^+ akımlarını düzelttiğini ve AP değişikliklerini düzelttiğini göstermiştir. Ang II'nin etkinliğini ortadan kaldırmanın veya oluşumunu engellemenin diyabetin neden olduğu değişiklikleri ortadan kaldırdığını gösteren bu bulgular, Ang II sinyal zincirinin diyabetik kardiyomiyopatinin oluşumunda rol aldığına ilişkin iddiaları güçlendirmektedir.

Literatürde tip 1 diyabetin ventrikül hücrelerinde bazal $[Ca^{2+}]_i$ seviyesini değiştirmediği (Yu ve ark., 1997) ya da azalttığı (Hayashi ve Noda, 1997) yönünde sonuçlar ortaya konmuştur. Ancak yakın zamanda Norby ve ark., (2004) STZ verilerek diyabet oluşturulmuş farelerde bazal $[Ca^{2+}]_i$'un arttığını gösteren, sonuçlarımızla uyumlu bulgularını yayınlamışlardır. Bizim çalışmamızda da, dinlenim durumundaki kardiyomiyositlerden yapılan kayıtlarda diyabetin bazal $[Ca^{2+}]_i$ seviyesini arttırdığı gözlenmiştir. Bunun yanında, 6 saatlik candesartan uygulamasının diyabetik kardiyomiyositlerin bazal $[Ca^{2+}]_i$ seviyesini normal değerlerine düşürdüğü tespit edilmiştir. Bulgularımız, diyabetik koşullarda dinlenim halinde bile ventrikül hücrelerinde Ca^{2+} yüklemesi olduğunu ve AT_1 reseptör blokajının artmış olan sitozolik $[Ca^{2+}]_i$ seviyesini düşürdüğünü göstermektedir. Literatürdeki sonuçlar arasındaki farklar diyabetin süresi, kayıtların alındığı ortam çözeltisinin içerdiği Ca^{2+} miktarı ve teknik farklılıklardan kaynaklanması olasıdır.

Bunların yanında, kalbin temel işlevi olan kasılma etkinliği sırasında $[Ca^{2+}]_i$ seviyesinin nasıl değiştiği ve diyabetin bu değişime etkisi çok önemlidir. Nitekim, diyabetik kardiyomiyositlerde elektriksel uyaran ile kaydedilen Ca^{2+} transientlerinin genliğinin düştüğü, tepeye çıkış ve iniş zamanlarının ise uzadığı gösterilmiştir (Choi ve ark, 2002; Norby ve ark., 2004). Bununla birlikte Ye ve ark. (2003) farelerle yaptıkları deneylerde genetik yoldan oluşturulmuş diyabetin kinetik parametrelerde uzamaya neden olduğunu, fakat Ca^{2+} transientlerinin genliklerini değiştirmediğini göstermişlerdir.

Ayrıca, PKC inhibisyonunun candesartan uygulamasıyla benzer şekilde Ca^{2+} transientlerinin genliğini ve kinetik parametrelerini kontrol değerlerine yakın seviyelere çektiği görülmüştür. Bu sonuçlar diyabetik kalpte oluşan $[Ca^{2+}]_i$ homeostazındaki değişikliklerin ve kasılma bozukluklarının Ang II ve onun sinyal sisteminin bir ajanı olan PKC ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Çünkü diyabetik sıçanlarda hem RAS'ın (Ang II, AT_1 reseptörleri) etkinliğinin arttığı, (Sechi ve ark., 1994; Brown ve ark., 1997; Fiordaliso ve ark., 2000) hem de PKC'nin ekspresyonunda artış olduğu birçok deneyle gösterilmiştir (Malhotra ve ark., 1997; Ishii ve ark., 1998; Shimoni, 1999). Bunun yanında, AT_1 reseptör uyarımının PLC aracılığıyla PKC'yi aktifleştirdiği de bilinmektedir (Baker ve ark., 1992). Malhotra ve ark (2001) Ang II veya glikoz ile inkübe edilen sıçan ventrikül hücrelerinde de PKC aktivitesinin arttığını, AT_1 reseptör blokajının bu etkiyi ortadan kaldırdığını göstermişlerdir. Ayrıca, PKC'nin hücre içindeki Ca^{2+}'un SR'a geri alımını engellediği de gösterilmiştir (Rogers ve ark., 1990). Nitekim laboratuarımızda yapılan daha önceki çalışmalarımızda kafein deneylerinden elde ettiğimiz sonuçlar da diyabetli kardiyomiyositlerin hücre içi Ca^{2+} depolarında azalma olduğunu ve kronik AT_1 reseptör blokajı bu etkiyi geri çevirdiği gösterilmiştir (Özdemir ve ark, 2005; Yaraş ve ark, 2005). Bu bulgu da, PKC'nin SERCA aktivitesini azaltarak Ca^{2+} depolarının dolmasını engellediği görüşünü (Rogers ve ark., 1990) desteklemektedir.

Kalp diğer birçok organlar gibi RA sistemine sahiptir (Lannoy ve ark, 1998; Dostal, 2000; Dostal ve ark, 1992; Fiordaliso ve ark, 2000) ve bu sistemin aktivasyonu diyabetik kardiyomiyopatinin oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Dzau, 2001). Gassanov ve ark (2006) bu düşünceyi destekleyen çalışmalarını yakın zamanda yayınlamışlardır. Bu çalışmada, insan atrial miyositlerinde AngII'nin Ca^{2+} spark parametrelerini etkilediğini ve 12 saatlik candesartan (1 μm) inkubasyonunun bu değişimi geri döndürdüğünü göstermişlerdir. Çalışmamızda, hem candesartan hem de BIM inkubasyonu değişen spark parametrelerini normal fizyolojik seviyelerine yaklaştırdığı görülmüştür. Bu çalışmaya ek olarak, diğer çalışmalarda kardiyak hücrelerde AT_1 reseptör blokajının diyabetin yol açtığı fonsiyon bozukluklarını azalttığını göstermiştir (Shimoni, 1999; 2001; Shimoni ve ark., 2005). Bu çalışmalar, bu araştırmada gösterildiği gibi diyabetin PKA aracılı RYR2 proteinin

hiperfosforilasyonuna ve RYR2'ye bağlı FKBP12.6 proteininin azalmasına yol açması sonucu anormal Ca^{2+} sızıntısının oluştuğunu ileri sürmekteler. PKA ve PKC kalp kasında eksprese olduğu (Keef ve ark., 2001) ve kalbin inotropik aktivitesini güçlü bir şekilde kontrol ettikleri (Haddad ve ark., 2004; Hussain ve ark., 1999; van der Velden ve ark., 2006) çok iyi bilinmektedir. Her iki protein kinaz da çeşitli reseptörleri, enzimleri ve transkripsiyon faktörlerini de içeren birçok proteini fosforile ederek hücreiçi sinyal iletim mekanizmalarında ve bu mekanizmalar arasındaki iletişimi güçlendiren önemli role sahiplerdir. Bu proteinler kalbin pompa aktivitesini düzenlerken Ang II nin içlerinde bulunduğu çeşitli etkenler ile aktive olurlar (Endoh, 1995). Candesartan yardımıyla Ca^{2+} spark parametrelerinde elde edilen geri dönüşü PKA aktivasyonu üzerine AngII'nin indirekt etkisi ile ilişkilendirmemiz olası gözükmektedir (Raimondi ve ark., 2004). Bu bulgular ışığında, diyabetik sıçan kalbinde, RYR2'nin hiperfosforilasyonu ile sonuçlanan hiperadrenerjik sinyalin hücreye iletilmesi RYR2 ve FKBP12.6 interaksiyonun bozulmasını tetiklendiğini söylemek mümkündür. Candesartan ise AT_1 üzerinden etki göstererek RYR2 hiperfosforilasyonunu azaltmaktadır. Çok yakın tarihli bir derlemede, Yano ve ark. (2006), hiperadrenerjik durumu baskılanması ile PKA aracılı RYR2'nin hiperfosforilasyonunu geri çevirerek, makromoleküler yapının normal halini kazanması ile SR dan Ca^{2+} sızıntısını önleyecek RYR2 stabilizasyonunu kalp yetmezliğinde yeni bir tedavi paradigması olarak tartışmaktadırlar. Bu hipotez burada tartışılan bulgular ile de desteklenmektedir.

Bazı çalışmalarda (Shimoni Y., 1999;2001; Shimoni ve ark., 2003) AT1 reseptör blokörleri ve antioksidanların kalp hücrelerinde diyabetin oluşturduğu fonksiyon bozukluklarını azalttığı bildirilmiştir. Hiperglisemi, oksidatif strese yol açan RAS ve PKC aktivasyonu gibi mekanizmaları da içeren çok çeşitli mekanizmalar ile oksidatif hasara öncülük ettiği ortaya konmuştur (Malhotra ve ark., 1997; Malhotra ve ark., 2001). Bu çalışmada da diyabetik durumda toplam ve serbest SH düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede düştüğü gözlenmiştir. Ayrıca, hem candesartan hem de BIM inkubasyonu bu değerleri kontrol düzeyine çekmiştir (Tablo 2). Bu bulguları RYR2 hiperfosforilasyonun AT1 reseptör blokajı ve PKC inhibisyonu ile geri dönüşü göz önünde tutularak ele aldığımızda diyabetik sıçan kalbi

kardiyomiyositlerinde, oksidatif stresin yerel ve global Ca^{2+} salınımlarında önemli rol oynadığı ileri sürülebilir. Bu düşünce, Bidasee ve ark.'nın (2003) disulfid bağ oluşumunun arttığı bulguları ile desteklenmektedir. SH grup modifikasyonunda diyabetin rolüni araştıran çalışmalar daha önce rapor edilmiştir. Bu çalışmada (Pierce ve Dhalla, 1985), diyabetik sıçan kalbinden izole edilen kardiyomiyositlerinde 5,5'-dithiolbis(2-nitrobenzoic acid)'e karşı miyofibril ATPase aktivitesi ve miyofibril SH reaktivitesi ölçülmüş ve sonuçta her iki parametreninde deprese olmasının yanında farklı SH grubu modifikasyonu ajanlarına farklı cevaplar oluştuğu gösterilmiştir. Bu nedenlerle, diyabet süreçinde kalpde gözlenen Ca^{2+} salınım mekanizmaları değişiklikleri üzerine candesartan etki mekanizmasının etkisinin modifiye SH gruplarını düzeltmesinin kısmi rolü olduğu söylenebilir

Sonuç olarak çalışmamızın ortaya koyduğu bulgular ve literatür bilgileri, diyabetik kalbin fonksiyon bozukluğunda $[Ca^{2+}]_i$ düzensizliklerinin rolü olduğunu ve bu bozuklukların AT_1 reseptör blokajı ile düzeldiğini göstermektedir. Ayrıca, bu etkinin RA sisteminin aktive ettiği PKC üzerinden olabileceğine ilişkin kanıtlar ortaya koymaktadır.

Ancak çalışmamız da, $[Ca^{2+}]_i$ homeostazındaki bozukluklarda diğer düzenleyici proteinlerin (SERCA, Na^+/Ca^{2+} değiş-tokuşçusu, PMCA, PLB) rolü olduğunu ve AT_1 reseptör blokajının bu proteinler üzerindeki etkisi hakkında bulgulara yer verilmemiştir. Bu proteinlerin etkilerinin araştırılması AT_1 reseptör blokörlerinin düzeltici etkisinin genel mekanizması hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlayacaktır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile diyabetik durumda meydana çıkan kardiyomiyopatinin altında yatan neden olarak gösterilen hücreiçi Ca^{2+} düzenlenmesinde RYR2'lerin durumu ve diyabetik koşullarda aktivitesinin arttığı gösterilmiş olan Ang II sinyal yolağının inhibisyonunun, bu hastalıkta gelişen kalp yetmezliklerine etkisi ve bu etkinin mekanizması araştırılmıştır. Bu amaçla, hücreiçi Ca^{2+} homeostazına etki eden I_{CaL}, lokal ve global hücreiçi Ca^{2+} derişimi değişimleri yanında, bu değişimlere etkili olabilecek biyokimyasal ölçümler de yapılmıştır.

Diyabetik sıçan kalplerinde gözlenen mekanik bozukluklarının altında yatan mekanizma olarak Ca^{2+} sparklarında oluşan değişimin sorumlu olabileceği gösterilmiştir.

Lokal Ca^{2+} salınımlarında oluşan değişimler ile paralel olarak, uyarılma-kasılma çiftleniminde önemli role sahip kazanç faktörünün hiperglisemik durumda hasara uğradığı gözlenmiştir.

Ca^{2+} homeostazında önemi vurgulanan RYR2 ve bu protein üzerinde düzenleyici role sahip FKBP12.6 seviyelerinin diyabetik sıçan kardiyomiyositlerinde azaldığı ortaya konmuştur.

Ayrıca, sözü geçen bu bozuklukların PKA aracılı RYR2 hiperfosforilasyonu sonucu meydana geldiği anlaşılmakla birlikte PKC etkinliği diyabette artmıştır.

AT_1 reseptör blokörü olan candesartan'ın 6–8 saatlik inkubasyonunun, diyabetli kalplerde bozulan Ca^{2+} spark parametrelerini önemli derecede düzeltmektedir.

Candesartan inkubasyonu diyabetik kardiyomiyositlerin baskılanmış olan kazanç faktörünü normal duruma yaklaştırmakta, ancak kontrol hücrelerinde önemli bir etki göstermemektedir.

Bunlara ek olarak, candesartan uygulaması hiperglisemik durumda azalan RYR2 ve FKBP12.6 protein seviyelerini ve artan RYR2 fosforilasyonunu geri çevirmektedir.

Diyabetli kardiyomiyositlerin PKC inhibitörü olan BIM ile inkübasyonu da hücre içi Ca^{2+} homeostazında AT_1 reseptör blokajı ile benzer etkiler göstermiştir. Bu sonuçlar, Ang II sinyal zincirinin bir basamağı olan PKC'nin diyabetik kalbin hücre içi Ca^{2+} homeostazındaki bozukluklarda rolü olabileceğini ve göstermektedir.

Sonuç olarak, candesartan tedavisinin diyabetli sıçan kalbinde bozulduğu bilinen hücreiçi Ca^{2+} homeostazında etkili parametreleri düzeltmesi, yerel AngII sisteminin bu bozukluklarda rolü olduğunu göstermektedir. Ayrıca, BIM'in de AT_1 reseptör blokajı ile benzer etkiler göstermesi, bu etkinin PKC üzerinden olduğuna işaret etmektedir.

Anti-hipertansif bir ilaç olarak kullanılan candesartan'ın, diyabetin yol açtığı kardiyovasküler sorunların çözümünde de etkili olabileceği bu çalışma ile gösterilmiştir.

Bununla birlikte, diyabetik durumun Ca^{2+} düzenlenmesinde yol açtığı sorunların daha iyi anlaşılabilmesi için ek çalışmalar da gerekmektedir. Öncelikle, bu etkilerin Ang II sinyal zinciri üzerinden olduğunu ifade edebilmek için aynı reseptöre duyarlı başka blokörler kullanılarak benzer sonuçlara ulaşılabilmelidir. Ayrıca bu öalışmada ortaya konulan protein kinazları aktive eden sinyal yolakları arasındaki etkileşimlerin aydınlatılmasına katkıda bulunabilecek delillere ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun yanında, etki mekanizmasını anlamak için dolaylı olmayan kanıtlar ortaya konulmalıdır.

ÖZET

Diyabetik Sıçan Kalbi Kalsiyum Homeostazını Düzenleyen Mekanizmaların İncelenmesi

Diyabetik kalplerde görünür koroner komplikasyondan bağımsız genel bir kardiyomiyopatinin geliştiği gösterilmiştir. Tip 1 diyabetik hayvanların kalplerinde tanımlanan mekanik fonksiyon bozuklukları hücreiçi Ca^{2+} konsantrasyonunu düzenleyen önemli mekanizmaların değişimi sonucu Ca^{2+} sinyalinde oluşan bozuluklardan ilerigeldiği bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, diyabetik kardiyomiyopati de hücreiçi Ca^{2+} düzenlenmesinde ryanodin reseptörü kalsiyum salınım kanallarının (RYR2) durumu ve diyabetik koşullarda aktivitesinin arttığı gösterilmiş olan Ang II sinyal yolağı inhibisyonunun, bu hastalıkta gelişen kalp yetmezliklerine etkisi ve bu etkinin mekanizması araştırmaktır. Sonuçlarımız STZ enjeksiyonu ile oluşturulmuş 5-haftalık diyabetik sıçan kardiyomiyositlerinde bazal Ca^{2+} düzeyi ile birlikte Ca^{2+}-spark frekansının anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir. Ca^{2+} tranzient genlikleri önemli derecede azalmış ve zaman profili uzamıştır. Ayrıca diyabetik kardiyomiyositlerde Ca^{2+}-sparklarının zamansal ve uzaysal özellikleri de anlamlı düzeyde değişmiştir. Bunlara ek olarak, diyabetik sıçan kalbi RYR2 hiperfosforile durumda bulunurken bu protein ve FK506 bağlayan protein (FKBP12.6) düzeyleri azalmıştır. Bu sonuçlar STZ ile oluşturulan diyabetik sıçan kalbi hücrelerinde artan bazal Ca^{2+} seviyesi ile birlikte yerel Ca^{2+} sinyalin bozulduğunu göstermektedir. Ayrıca, AT1 reseptör blokörü, candesartan ve PKC inhibitörü bisindolylmaleimide I (BIM) ile 6-8 saat inkübasyonu sonucu artan bazal Ca^{2+} seviyesi ve bozulan Ca^{2+} spark parametrelerini kısmi olarak kotrol düzeyine geri döndürdüğü gözlenmiştir. Bunlarla birlikte, candesartan ve BIM RYR2 hiperfosforilasyonunu ve azalan protein seviyelerini anlamlı düzeyde düzeltmiştir. Ayrıca, yine candesartan ve BIM diyabetik durumda artan PKC ve thiol oksidasyon düzeyini azaltmıştır. Sonuç olarak, candesartan tedavisinin diyabetli sıçan kalbinde bozulduğu bilinen hücreiçi Ca^{2+} homeostazında etkili parametreleri düzeltmesi, yerel AngII sisteminin bu bozukluklarda rolü olduğunu ve bu etkinin PKC üzerinden olduğuna işaret etmektedir.

Anahtar Sözcükler: Tip 1 Diyabet, Kalp, Hücre İçi Kalsiyum, Ryanodin Reseptörleri, Candesartan, Protein Kinazlar.

SUMMARY

Investigation of Underlying Mechanisms of Calcium Homeostasis in Diabetic Rat Heart

The defects identified in the mechanical activity of the hearts from type 1 diabetic animals include alteration of Ca^{2+} signaling via changes in critical processes that regulate intracellular Ca^{2+} concentration. These defects result partially from a dysfunction of cardiac ryanodine receptor calcium release channel (RyR2). The present study was designed to determine whether the properties of the Ca^{2+} sparks might provide insight into the role of RyR2 in the altered Ca^{2+} signaling in cardiomyocytes and to evaluate a potential role of an AT_1 blocker, candesartan on abnormal Ca^{2+} release mechanisms and its relationship with PKC in the cardiomyocytes from streptozotocin-induced diabetic rats. Basal Ca^{2+} level as well as Ca^{2+}-spark frequency of cardiomyoctes isolated from 5-week streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats significantly increased with respect to aged-matched control rats. Ca^{2+} transients exhibited significantly reduced amplitude and prolonged time courses in diabetic rats. Spatio-temporal properties of the Ca^{2+} sparks in diabetic cardiomyocytes were also significantly altered. In addition, RyR2 from diabetic rat hearts were hyperphosphorylated and protein levels of both RyR2 and FKBP12.6 depleted. These data show that STZ-induced diabetic rat hearts exhibit altered local Ca^{2+} signaling with increased basal Ca^{2+} level. Cardiomyocytes incubated with either candesartan or PKC inhibitor bisindolylmaleimide I (BIM) for 6-8 hours at 37°C. Both candesartan and BIM applied on diabetic cardiomyocytes restored significantly the altered basal Ca^{2+} level, and spatio-temporal properties of the Ca^{2+} sparks. In addition, candesartan and BIM antagonized significantly the hyperphosphorylation of RyR2, and restored the depleted protein levels of both RyR2 and FK506 binding protein 12.6 (FKBP12.6). Furthermore, candesartan and BIM also reduced the increased PKC and thiol oxidation levels. Taken together, these data demonstrate that AT1 receptor blockade protects cardiomyocytes from development of cellular alterations typically associated with Ca^{2+} release mechanisms in *diabetes mellitus*.

Key Words: Type 1 Diabetes, Heart, Intracellular Calcium, Ryanodine Receptors, Candesartan, Protein Kinases

KAYNAKLAR

AHMED SS, JAFERI GA, NARANG RM, REGAN TJ. (1975) Preclinical abnormality of left ventricular function in diabetes mellitus. *Am Heart J.* **89(2)**:153-8.

AIELLO, E.A., CINGOLANI, H.E. (2001). Angitensin II stimulates cardiac L-type Ca^{2+} current by a Ca^{2+}– and protein kinase C-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **280:** H1528-H1536.

AMOS AF, MCCARTY DJ, ZIMMET P.DIABET MED. (1997) The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet. Med.* **14**:S1-85.

ARISON RN, CIACCIO EI, GLITZER MS, CASSARO JA, PRUSS MP. (1967) Light and electron microscopy of lesions in rats rendered diabetic with streptozotocin. *Diabetes*. **16(1)**:51-6.

AYAZ, M., OZDEMIR, S., UGUR, M., VASSORT, G., TURAN, B. (2004). Effects of selenium on altered mechanical and electrical cardiac activities of diabetic rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **426:** 83-90.

BAILEY C.C. VE BAILEY O.T. (1943). The production of *diabetes mellitus* in rabbits with alloxan. *Jama.***122**:1165-1166.

BAKER, K.M., BOOZ, G.W., DOSTAL, D.E. (1992). Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac rennin-angiotensin system. *Annu. Rev. Physiol.* **54:** 227-241.

BARRERE-LEMAIRE, S., PIOT, C., LECLERCQ, F., NARGEOT,J., AND RICHARD, S. (2000). Facilitation of L-type calciumcurrents by diastolic depolarization in cardiaccells: impairment in heart failure. *Cardiovasc. Res.* **47**:336–349.

BEAN BP. (1989) Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol*. **51**:367-84.

BELKE DD, DILLMANN WH. (2004) Altered cardiac calcium handling in diabetes. *Curr Hypertens Rep.* **6(6):**424-9.

BERNSTEIN KE, BERK BC. The biology of angiotensin II receptors. (1993) *Am J Kidney Dis.* 22(5):745-54.

BERS, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* **415:** 198-204.

BIDASEE KR, DİNCER UD, BESCH HR JR. (2001) Ryanodine receptor dysfunction in hearts of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Pharmacol* **60:**1356–64

BIDASEE KR, NALLANI K, BESCH HR JR, DİNCER UD. (2003) Streptozotocin-induced diabetes increases disulfide bond formation on cardiac ryanodine receptor (RyR2). *J Pharmacol Exp Ther* **305**:989 –98

BLINKS, J.R., AND HANNON, J.D. (1996). Evaluation of changes in myofibrillar Ca2+ sensitivity in intact cardiac cells. In *Molecular physiology and pharmacology of cardiac ion channels and transporters.* M. Morad, S. Ebashi, W. Trautwein, and K. Kurachi, editors. Kluwer Academic. Dordrecht, The Netherlands/London, United Kingdom. 513–529.

BORCZUK A, FACTOR SM, CHARRON MJ, FEIN FS, VAN HOEVEN KH, SONNENBLICK EH. (1996) Myocardial alterations in diabetes and hypertension. *Diabetes Res Clin Pract.* **31**:S133-42.

BOTTARİ SP, DE GASPARO M, STECKELİNGS UM, LEVENS NR. (1993) Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications. *Front Neuroendocrinol.* **14(2):**123-71.

BRACKEN, N.K., SINGH, J., WINLOW, W., HOWARTH, F.C. (2003). Mechanisms underlying contractile dysfunction in streptozotocin-induced type 1 and type 2 diabetic cardiomyopathy. In: *Artherosclerosis,hypertension and diabetes,*Ed.: G.N. Pierce, M. Nagano, P. Zahradka, N.S. Dhalla. Boston:Kluver Academic Publishers, p.: 386-407.

BRADFORD MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72**:248-54.

BRODDE OE, O'HARA N, ZERKOWSKI HR, ROHM N. (1984) Human cardiac beta-adrenoceptors: both beta 1- and beta 2-adrenoceptors are functionally coupled to the adenylate cyclase in right atrium. *J Cardiovasc Pharmacol.* **6(6)**:1184-91.

BROWN, L., WALL, D., MARCHANT, C., SERNIA, C. (1997). Tissue-specific changes in angitensin II receptors in streptozotocin-diabetic rats. *J Endocrinol.* **154:** 355-362.

CALLEWAERT G. (1992) Excitation-contraction coupling in mammalian cardiac cells. *Cardiovasc Res.* **26(10)**:923-32.

CAMPBELL RK. (1984) Ask a pharmacist. Are there any methods than can be used to determine the specific effect that a drug has on blood glucose levels? *Diabetes Educ*. **10(1)**:53.

CARAFOLI, E. (1989). The homeostasis of calcium in heart cells. *J.Moll. Cell. Cardiol.* **17**:203-212.

CHOI, K.M., ZHONG, Y., HOIT, B.D., GRUPP, I.L., HAHN, H., DILLY, K.W., GUATIMOSIM, S., LEDERER, W.J., MATLIB, M.A. (2002). Defective intracellular Ca^{2+} signaling contributes to cardiomyopathy in type 1 diabetic rats. *Am. J. Physiol.* **283:** H1398-H1408.

CHUNG, O., UNGER, T. (1998). Pharmacology of angotensin receptors and AT1 receptor blockers. *Basic. Res. Cardiol.* **93:** 15-23.

CLEEMANN L, MORAD (1991) M. Role of Ca2+ channel in cardiac excitation-contraction coupling in the rat: evidence from Ca2+ transients and contraction. *J Physiol.* **432:**283-312.

DAI S, FRASER H, YUEN VG, MCNEILL JH. (1994) Improvement in cardiac function in streptozotocin-diabetic rats by salt loading. *Can J Physiol Pharmacol.* **72(11)**:1288-93.

DAVIS SN, GEHO B, TATE D, GALASSETTI P, LAU J, GRANNER D, MANN S. (2001) The effects of HDV-insulin on carbohydrate metabolism in Type 1 diabetic patients. *J Diabetes Complications*. **15(5):**227-33.

DE LANNOY LM, DANSER AH, BOUHUIZEN AM, SAXENA PR, SCHALEKAMP MA. (1998) Localization and production of angiotensin II in the isolated perfused rat heart. *Hypertension*. **31(5):**1111-7.

DE MELLO, W.C., JAN DANSER, A.H. (2000). Angiotensin II and the heart. *Hypertension*. **35:** 1183-1188.

DHALLA, N.S., LIU, X., PANAGIA, V., TAKEDA, N. (1998). Subcellular remodeling and heart dysfunction in chronic diabetes. *Cardiovasc. Res.* **40:** 239-247.

DHALLA, N.S., PIERCE, G.N., INNES, I.R., BEAMISH, R.E. (1985). Pathogenesis of cardiac dysfunction in diabetes mellitus. *Can. J. Cardiol.* **1:** 263-281.

DILLMANN WH. (1980) Diabetes mellitus induces changes in cardiac myosin of the rat. *Diabetes.* **29(7):**579-82.

DILLMANN WH. (1988) Diabetes mellitus-induced changes in the concentration of specific mRNAs and proteins. Diabetes Metab Rev. Dec;4(8):789-97.

DINH DT, FRAUMAN AG, JOHNSTON CI, FABIANI ME. (2001) Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin Sci (Lond).* **100(5)**:481-92.

DINH, D.T., FRAUMAN, A.G., JOHNSTON, C.I., FABIANI, M.E. (2001). Angiotensin receptors: distribution, signaling and function. *Clin. Sci.* **100:** 481-492.

DOSTAL DE, ROTHBLUM KN, CHERNIN MI, COOPER GR, BAKER KM. (1992) Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localizedrenin-angiotensin system in neonatal rat heart. *Am J Physiol.* **263(4 Pt 1):**C838-50.

DOSTAL, D.E. (2000). The cardiac renin–angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. *Reg. Pep.* **91:** 1-11.

DUNN J.S., McLETCHIE N.G.P. (1943) Experimental alloxan diabetes rat. *Lancet* **2:**382-387

DZAU VJ. (2001)Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension.* **37(4):**1047-52

ELLIOT, R.B., OBRIAN, D., ROY, C.C. (1965) An abnormal insulin in juvenile *diabetes mellitus. Diabetes.* **14:**780-785.

ENDOH M. (1995) The effects of various drugs on the myocardial inotropic response. *Gen Pharmacol***. 26:** 1-31.

ENTMAN, M., BICK, R., CHU, A., VAN WINKLE, W., TATE, C. (1986). The Mechanism of nucleotide Induced Calcium Translocation Across Sarcoplasmıc Retıculum Membranes: Evidence for a Non-Translocated Intermediate Pool of Calcium. *J Mol Cell Cardıol.* **18**: 781-792.

FABIATO A, FABIATO F. (1979) Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol*. **41**:473-84.

FACTOR SM, MINASE T, SONNENBLICK EH. (1980) Clinical and morphological features of human hypertensive-diabetic cardiomyopathy. *Am Heart J.* **99(4)**:446-58.

FEIN FS, STROBECK JE, MALHOTRA A, SCHEUER J, SONNENBLICK EH. (1981) Reversibility of diabetic cardiomyopathy with insulin in rats. *Circ Res.* **49(6)**:1251-61.

FEIN, F.S. (1990). Diabetic cardiomyopathy. *Diab. Care.* **13:** 1169-1179.

FEIN, F.S., KORNSTEIN, L.B., STROBECK, J.E., CAPASSO, J.M., SONNENBLICK, E.H. (1980). Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circ. Res.* **47(6):** 922-33.

FEIN, F.S., SONNENBLICK, E.H. (1985). Diabetic cardiomyopathy. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **27(4):** 255-70.

FILL M, COPELLO JA (2002) Ryanodine receptor calcium release channels. *JA.Physiol Rev.* **82(4):**893-922.

FIORDALISO, F., LI, B., LATINI, R., SONNENBLICK, E.H., ANVERSA, P., LERI, A., KAJSTURA, J. (2000). Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats is angiotensin II-dependent. *Lab. Invest.* **80(4):** 513-527.

FORBES, M., SPERELAKIS, N (1982) Bridging Junctional Processes in Couplings of Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle. *Muscle Nerve*. **5**: 674.

FOUSECA VA, STONE A, MUNSHI M. (1997) Oxidative stress in diabetic macrovascular disease: Does homocysteine play a role? *South Med J* **90**:903-906.

FRANK RN. (1991) On the pathogenesis of diabetic retinopathy. A 1990 update. *Ophthalmology* **98**:586-593.

FREEMAN BA, CRAPO JD. (1982) Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Eab Invest* **47**:412-426.

GALDERISI, M., ANDERSON, K.M., WILSON, P.W., LEVY, D. (1991). Echocardiographic evidence for the existence of a distinct diabetic cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* **68(1):** 85-9.

GANGULY PK, PIERCE GN, DHALLA KS, DHALLA NS. (1983) Defective sarcoplasmic reticular calcium transport in diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol.* **244(6)**:E528-35.

GASSANOV N, BRANDT MC, MICHELS G, LINDNER M, ER F, HOPPE UC. (2006) Angiotensin II-induced changes of calcium sparks and ionic currents in human atrial myocytes: potential role for early remodeling in atrial fibrillation. **Cell Calcium. 39(2):**175-86.

GAUTHIER C, TAVERNIER G, CHARPENTIER F, LANGIN D, LE MAREC H. (1996) Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest*. **98(2)**:556-62.

GILLERY P, MONBOISSE JC, MAQUART FX, BOREL JP. (1988) Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabetes Metab* **14**:25-30.

GIUGLIANO D, CERIELLO A, PAOLISSO G. (1995) Diabetes mellitus, hypertension and cardiovascular disease: Which role for oxidative stress? *Metabolism* **44:**363-368.

GOMEZ AM, SCHUSTER I, FAUCONNIER J, PRESTLE J, HASENFUSS G, RICHARD S: (2004) FKBP12.6 overexpression decreases Ca2+ spark amplitude but enhances [Ca2+]i transient in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**:H1987–H1993,

GOMEZ AM, VALDIVIA HH, CHENG H, LEDERER MR, SANTANA LF, CANNELL MB, MCCUNE SA, ALTSCHULD RA, LEDERER WJ. (1997) Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophyand heart failure. *Science.* **276(5313)**:800-6.

GORZA, L., MENABO, R., VITADELLO, M., BERGAMINI, C.M., DI LISA, F. (1996). Cardiomyocyte troponin T immunoreactivity is modified by cross-linking resulting from intracellular calcium overload. *Circulation.* **93(10):** 1896-904.

GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M., TSIEN, R. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260:** 3440-3450.

GUATIMOSIM S, DILLY K, SANTANA LF, SALEET JM, SOBIE EA, LEDERER WJ: (2002) Local Ca(2+) signaling and EC coupling in heart: Ca(2+) sparks and the regulation of the [Ca(2+)](i) transient. *J Mol Cell Cardiol* **34:**941–950,

HADDAD GE, COLEMAN BR, ZHAO A, BLACKWELL KN. (2004) Modulation of atrial contraction by PKA and PKC during the compensated phase of eccentric cardiac hypertrophy, *Basic Res Cardiol.* **99:** 317-27.

HAKAMATA Y, NAKAI J, TAKESHIMA H, AND IMOTO K. (1992) Primary structureand distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett* **312**: 229–235.

HANEDA M, POLONSKY KS, BERGENSTAL RM, JASPAN JB, SHOELSON SE, BLIX PM, CHAN SJ, KWOK SC, WISHNER WB, ZEIDLER A, (1984) Familial hyperinsulinemia due to a structurally abnormal insulin. Definition of an emerging new clinical syndrome. *N Engl J Med.* **310(20):**1288-94.

HAYASHI T, SOHMIYA K, UKIMURA A, ENDOH S, MORI T, SHIMOMURA H, OKABE M, TERASAKI F, KITAURA Y. (2003) Angiotensin II receptor blockade

prevents microangiopathy and preserves diastolic function in the diabetic rat heart. *Heart.* **89(10):**1236-42.

HAYASHI, H., NODA, N. (1997). Cytosolic Ca^{2+} concentration decreases in diabetic rat myocytes. *Cardiovasc. Res*. **34:** 99-103.

HE J, CONKLIN MW, FOELL JD, WOLFF MR, HAWORTH RA, CORONADO R, KAMP TJ. (2001) Reduction in density of transverse tubules and L-type Ca(2+) channels in canine tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc Res.* **49(2):**298-307.

HEYLIGER CE, PRAKASH A, MCNEILL JH. (1987) Alterations in cardiac sarcolemmal Ca2+ pump activity during diabetes mellitus. *Am J Physiol.* **252**:H540-4.

HIRSCH AT, TALSNESS CE, SCHUNKERT H, PAUL M, DZAU VJ. (1991) Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. *Circ Res.* **69(2):**475-82.

HOBAI, I.A., AND O'ROURKE, B. (2001). Decreased sarcoplasmic reticulum calcium content is responsible for defective excitation-contraction coupling in canine heart failure. *Circulation.* **103**:1577–1584.

HOENACK, C., ROESEN, P. (1996). Inhibition of angiotensin type 1 receptor prevents decline of glucose transporter (GLUT4) in diabetic rat heart. *Diabetes.* **45:** S82-S87.

HOLLOWAY, C., KOTSANAS, G., WENDT, I. (1999). Acute effects of taurine on intracellular calcium in normal and diabetic cardiac myocytes. *Pflugers. Arch.* **438:** 384-391.

HULSMANN, W.C. (1983). On the mechanism of the calcium paradox: the release of hydrolytic enzymes. *Eur. Heart. J.* **Suppl H:** 57-61.

HUNT JV, SMITH CCT, WOLFF SP. (1990) Autooxidative glycosylalion and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* **39:**1420-1424.

HUSSAIN M, DRAGO GA, BHOGAL M, COLYER J, ORCHARD CH. (1999) Effects of the protein kinase A inhibitor H-89 on Ca2+ regulation in isolated ferret ventricular myocytes. *Pflugers Arch.* **437:** 529-37.

IBRAHIM MM. RAS inhibition in hypertension. (2006) *J Hum Hypertens*. **20:**101-8.

ISHII, H., KOYA, D., KING, G. L. (1998). Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J. Mol. Med.* **76:** 21-31.

ISHIKAWA, T., KAJIWARA, H., KURIHARA, S. (1999). Alterations in contractile properties and Ca^{2+} handling in streptozotocin-induced diabetic rat myocardium. *Am. J. Physiol.* **277:** H2185-2194.

JANVIER, N.C., BOYETT, M.R. 1(996). The role of Na-Ca exchange current in the cardiac action potential. *Cardiovasc. Res.* **32:** 69-84.

KAKKAR R, KALRA J, MANTHA V, PRASAD K. (1995) Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* **151:**113-119.

KAKKAR R, MANTHA SV, KALRA J, PRASAD K. (1996) Time course study of oxidative stress in aorta and heart of diabetic rat. *Clin Sci* **91**:441-448.

KALANTARINIA K, OKUSA MD. (2006) The renin-angiotensin system and its blockade in diabetic renal and cardiovascular disease. *Curr Diab Rep.***6:**8-16.

KARASU C, OZTURK Y, ALTAN N, YILDIZOGLU-ARI N, IKIZLER C, ALTAN VM. (1990) Thyroid hormones mediated effect of insulin on alloxan diabetic rat atria. *Gen Pharmacol*. **21(5)**:735-40.

KATZ, A.M.. (1991), Physiology of the heart,Ed 2,Raven Press, New York, pp:37-61.

KAUMANN AJ. (1997) Four beta-adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. *Trends Pharmacol Sci.* **18(3)**:70-6.

KEEF KD, HUME JR, ZHONG J. (2001) Regulation of cardiac and smooth muscle Ca(2+) channels (Ca(V)1.2a,b) by protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol.* **281(6):**C1743-56.

KIM S, IWAO H. (2000) Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev.* 52(1):11-34.

KOLTAI MZ, HADHAZY P, POSA I, KOCSIS E, WINKLER G, ROSEN P, POGATSA G. (1997) Characteristics of coronary endothelial dysfunction in experimental diabetes. *Cardiovasc Res.* **34(1)**:157-63.

KOSUGI R, SHIOI T, WATANABE-MAEDA K, YOSHIDA Y, TAKAHASHI K, MACHIDA Y, IZUMI T. (2006) Angiotensin II receptor antagonist attenuates expression of aging markers in diabetic mouse heart. *Circ J.* **70(4):**482-8.

KRANKENHAUS, M.S. (1990). Epidomology and and risk factors of macrovascular disease in *diabetes mellitus*. *J.Horm.Metab.Res.* **22**: 8-11.

LAI, F., ANDERSON, K., ROUSSEAU, E., LIU, Q., MEISSNER, G.(1988a) Evidence for a Ca^{2+} Channel Within the Ryanodine Receptor Complex from Cardiac Sarcoplasmic Reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **151**: 441-449.

LAI, F., ERICKSON, H., ROUSSEAU, E., LIU, Q., MEISSNER, G.(1988b). Purification and Reconstitution of the Calcium Release Channel from Skeletal Muscle,

LARNER, J., (1985) Insulin and oral hypoglycemic drugs, glucagons. In:Goodman and Gilmans the pharmacological basic therapeutics. 7.th Edition. A. G.,Goodman, LS Rail T W Murad, F., MacMillan Publ. Comp., New York 1490-1516.

LINDNER, M., ERDMANN, E., AND BEUCKELMANN, D.J. (1998) Calcium content of the sarcoplasmic reticulum in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**:743–749

LINDPAINTNER K, LU W, NEIDERMAJER N, SCHIEFFER B, JUST H, GANTEN D, DREXLER H.J (1993) Selective activation of cardiac angiotensinogen gene

expression in post-infarction ventricular remodeling in the rat. *Mol Cell Cardiol*. **125(2):**133-43.

LITWIN, S.E., ZHANG, D., AND BRIDGE, J.H. (2000). Dyssynchronous Ca2+ sparks in myocytes from infarcted hearts. *Circ. Res.* **87**:1040–1047.

LIU, X., TAKEDA, N., DHALLA, N.S. (1997). Myosin light chain phosrylation in diabetic cardiomyopathy in rats. *Metabolism*. **46**:71-75.

LIU,X., TAKEDA.N. DHALLA. N.S. (1996). Troponin I phosphorylation in heart homogenate from diabetic rat. *Biochim. Biophys. Acta.,* **1316**:78-84

LOPASCHUK, G.D., EIBSCHUTZ. B., KATZ, S., McNEILL, J.H. (1983) depression of calcium transport in SR from diabetic rats lack of involvement of specific regulatorv mediators. *Gen. Pharmacol.* **15**:1.

LOPASCHUK, G.D., KATZ. S., McNEILL. J.H. (1982). Studies on the by which diabetes alters cardiac sarcoplasmic reticulum function. *Proc. Pharmacol Soc*. **24**:47.

LOPASCHUK. G.D., TAHILIANI, A.G., VADLAMUDI, R.V.S.V., KATZ S., McNEILL J.H. (1983). Cardiac sarcoplasmic reticulum function in insulin or carnitine created diabetic rats. *Am. J. Physiol.,* **245**:H969-H976.

LUKENS, F.D.W. (1937). Pancreotectomy in the pig. *Am. J. Physiol* **108**:320-327.

MACLAREN, N.K. (1977). Viral and immunological bases of beta-cell in insulin dependent diabetes. *Am. J. Dis. Child.* **131**: 1149-1153.

MADSBAD, S. (1983). Prevalance of residual beta-cell function and its metabolic consequences in type 1 diabetes. *Diabetologia,* **24:** 141-148.

MAK DHF, IP SP, LI PC. POOU MKT, KO KM. (1996) Alterations in tissue glutathione antioxidant system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* **162:**153-158.

MAKING, N. . DHALLA, K.S. . ELIMBAN. V. , DHALLA, N.S. (1987). Sarcolemmal C2+ transport in STZ induced diabetic cardiomyopathy in rats. *Am. J. Physiols. 253*:E202-207.

MALHOTRA, A., BARINDER, P.S.K., CHEUNG, S., OPAWUMI, D., MEGGS L.G. (2001). Angiotensin II promotes gucose-induced activation of cardiac ptotein kinase C isozymes and phoshorylation of troponin I. *Diabetes.* **50:** 1918-1926.

MALHOTRA, A., PENPARGKUL, S., FEIN. F.S., SONNENBLICK, E.H., SCHEUR, J. (1981). The effect of STZ induced diabetes in rats on cardiac contractile proteins. Circ. Res., 49:1243-1250.

MALHOTRA, A., REICH, D., REICH, D., NAKOUZI, A., SANGHI, V., GEENEN, D.L., BUTTRICK, P.M. (1997). Experimental diabetes is associated with functional activation of protein kinase Cε and phosphorylation of troponin I in the heart, which are prevented by angiotensin II receptor blockade. *Circ. Res.* **81:** 1027-1033.

MARKS AR. (2001) Ryanodine receptors/calcium release channels in heart failure and sudden cardiac death. *J Mol Cell Cardiol.* **33(4):**615-24.

MARKS, A.R. (2002b). Ryanodine receptors, FKBP12, and heart failure. *Front. Biosci.* **7**:d970–d977.

MARKS, A.R., MARX, S.O., AND REIKEN, S. (2002a). Regulation of ryanodine receptors via macromolecular complexes: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**:166–170.

MARX SO, REIKEN S, HISAMATSU Y, JAYARAMAN T, BURKHOFF D, ROSEMBLIT N, MARKS AR (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* **101:**365–376,

MATSUMORI A. (2005) Candesartan may prevent diabetes in people with heart failure. *Commentary. Evid Based Cardiovasc Med.* **9(4):**268-70.

MATSUMURA, Y., SAEKI, E., OTSU, K., MORITA, T., TAKEDA, H., KUZUYA, T., HORI, M., KUSUOKA, H. (2001). Intracellular calcium level required for calpain activation in a single myocardial cell. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33(6):**1133-42.

McNEILL, J.H., TAHILIANI, A.G. (1985). Diabetes induced cardiac changes. Trends. Pharmacol. Sci., 9:364.

MCNEILL, JH., DELGATTY, HL., BATTELL, ML. (1991). Insulinlike effects of sodium selenate in streptozocin-induced diabetic rats. Diabetes. **40(12):** 1675-8.

MEISSNER, G.(1975). Isolation and characterization of two types of SR vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* **389:**51-68.

NAKAI J, IMAGAWA T, HAKAMATA Y, SHIGEKAWA M, TAKESHIMA H, ANDNUMA S. (1990) Primary structure and functional expression from cDNA ofthe cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett* **271:** 169–177.

NILIUS, B., HESS. P., LANSMAN, J.B., TSIEN, R.W. (1985). A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature,* **316**:44446.

NITENBERG, A., VALENSI, P., SACHS, R. (1993). Impairment of coronary vascular reserve and Ach- induced coronry vasodilatation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function. *Diabetes.* **42**:1017-1025

NOLTE, M.S., KARAM, J.H. (2001). Pancreatic hormones and antidiabetic drugs. In: Basic and clinical pharmacology, chapter 41, 8th edition, edited by: Katzung, P.G.

NORBY, F.L., ABERLE II, N.S., KAJSTURA, J., ANVERSA, P., REN, J. (2004). Transgenic overexpression of insulin-like growth factor I prevents streptozotocin-induced cardiac contractile dysfunction and β-adrenergic response in ventricular myocytes. *J. Endocrinol.* **180:** 175-182.

O'ROURKE B, KASS DA, TOMASELLI GF, KAAB S, TUNIN R, MARBAN E. (1999) Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in caninetachycardia-induced heart failure, I: experimental studies. *Circ Res.* **84(5)**:562-70.

OTSU K, WILLARD HF, KHANNA VK, ZORZATO F, GREEN NM, AND MACLENNANDH. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding the Ca2+ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmicreticulum. *J Biol Chem* **265:** 13472–13483.

ÖZDEMİR S, UĞUR M, GÜRDAL H, TURAN B. (2005) Treatment with AT(1) receptor blocker restores diabetes-induced alterations in intracellular Ca(2+) transients and contractile function of rat myocardium. *Arch Biochem Biophys.* **435(1):**166-74.

PENPARGKUL, S., FEIN, F.S., SONNENBLICK, E.H.. SCHEUER, J. (1981). Depressed cardiac sarcoplasmic reticular function from diabetic rats. *J. Moll. Cell. Cardiol.* **13:**303-309.

PETROFF MG, AIELLO EA, PALOMEQUE J, SALAS MA, MATTIAZZI A. (2000) Subcellular mechanisms of the positive inotropic effect of angiotensin II in cat myocardium. *J Physiol.* **529 Pt 1**:189-203.

PIERCE, G.N., DHALLA, N. S. (1981). Cardiac myofibrillar ATPase activity in diabetic rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **13**:1063-1069.

PIERCE, G.N., DHALLA, N. S. (1983). Sarcolemmal Na+-K+-ATPase activity in diabetic rat heart. *Am. J. Physiol* **245**:C241-247.

PIERCE, G.N., GANGULY, P.K., DZURBA. A., DHALLA N. S. (1985). Modification of the function of cardiac subcellular organelles by insulin, *Adv. Myocardiol.* **6**: 113-125.

PIERCE, G.N., RUSSEL, J.C. (1997). Regulation of intracellular Ca^{2+} in the heart during diabetes. *Cardiovasc. Res.* **34:**41-47.

PIOT C, LEMAIRE S, ALBAT B, SEGUIN J, NARGEOT J, RICHARD S. (1996) High frequency-induced upregulation of human cardiac calcium currents.*Circulation.* **93(1)**:120-8.

PORTE, D., HALTER, J.B. (1981). The endocrine pancreas and diabetes mellitus. In:Textbook of endocrinology, Ed: Williams, R.H., Phladelphia p: 715-717.

RAEV, D.C. (1994). Which left ventricular function is impaired earlier in the evolution of diabetic cardiomyopathy. *J. Diabetes Care*, **17:**633-539.

RAIMONDI L, PAOLI PD, MANNUCCI E, LONARDO G, SARTIANI L, BANCHELLI G, PIRISINO R, MUGELLI A, CERBAI E. (2004) Restoration of cardiomyocyte functional properties by angiotensin II receptor blockade in diabetic rats. *Diabetes* **53:**1927-33,

RAKIETEN N RAKIETEN, W.L., NAOLKAMI. M.V. (1963) Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemotherapy Rept.,* **29**: 91-98.

RAMANADHAM, S , TENNER, T. E. (1987). Alterations in the myocardial beta adrenoceptor system of STZ diabetic rats. *Eur. J Pharmacol.* . **136:**377-389.

ROGERS, T.B., GAA, S.T., MASSEY, C., DOSEMECI, A. (1990). Protein kinase C inhibits Ca^{2+} accumulation in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **265(8):** 4302-4308.

ROZANSKI, G.J., XU, Z. (2002). Sulfhydryl modulation of K^{+} channels in rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34:** 1623-1632.

RUBLER S, DLUGASH J, YUCEOGLU YZ, KUMRAL T, BRANWOOD AW, GRISHMAN A. (1972) New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol.* **30(6):**595-602.

RUSS, M. , REINAUER, H., ECKEL, J. (1991). Diabetes induced decrease in the mRNA coding for sarcoplasmic reticulum Ca ATPaz in adult rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys. Res. Commun.,* **178**:906-912.

SAH, R., RAMIREZ, R.J., AND BACKX, P.H. (2002). Modulation of Ca2+ release in cardiac myocytes by changes in repolarization rate: role of phase-1 action potential repolarization in excitation-contraction coupling. *Circ. Res.* **90**:165–173.

SATO, N., FUJIO, Y., YAMADA-HONDA, F., FUNAI, H., WADA, A., KAWASHIMA, S., AWATA, N., SHIBATA, N. (1995). Elevated calcium level induces calcium-

dependent proteolysis of A-CAM (N-cadherin) in heart--analysis by detergent-treated model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217(2):** 649-53.

SCHUNKERT H, DZAU VJ, TANG SS, HIRSCH AT, APSTEIN CS, LORELL BH. (1990) Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. J Clin Invest. **86(6):**1913-20.

SECHI, L.A., GRIFFIN, C.A., SCHAMBELAN, M. (1994). The cardiac renin-angiotensin system in STZ-induced diabetes. *Diabetes.* **43:** 1180-1184.

SEVERS, N. (1990). Isolated adult cardiomyocytes. Piper, H.M. and Isenberg, G.(ed). CRC Pres, Boca Raton, 3-41.

SHAPIRO, L.M. (1982). Echocardiographic features of impaired ventricular function in diabetes mellitus. *Br.Heart.J.,* **47**:439-444.

SHIMONI, Y. (1999). Protein kinase C regulation of K^+ currents in rat ventricular myocytes and its modification by hormonal status. *J. Physiol.* **520(2):** 439-449.

SHIMONI, Y. (2001). Inhibition of the formation or action of angiotensin II reverses attenuated K^+ currents in type 1 and type 2 diabetes. *J. Physiol.* **537(1):** 83-92.

SHIMONI, Y., FIREK, L., SEVERSON, D., GILES, W. (1994). Short-term diabetes alters K^+ currents in rat ventricular myocytes. *Circ. Res. 74***:** 620-628.

SHIMONI, Y., LIU, X-F. (2003). Role of PKC in autocrine regulation of rat ventricular K^+ currents by angiotensin and endothelin. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **284:** H1168-H1181.

SHİRANİ J, LOREDO ML, ECKELMAN WC, JAGODA EM, DİLSİZİAN V. (2005) Imaging the renin-angiotensin- aldosterone system in the heart. *Curr Heart Fail Rep.* **2**:78-86.

TAKEDA, N., DIXON, I.M.C., HATA, T. (1996). Sequence of alterations in subcellular organelles during the development of heart dysfunction in diabetes. *Diabetes. Res. Clin. Pract.,* **30**:S113-S122.

TAKESHIMA H, NISHIMURA S, MATSUMOTO T, ISHIDA H, KANGAWA K, MINAMINO N,MATSUO H, UEDA M, HANAOKA M, HIROSE T. (1989) Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature.* **339(6224):**439-45.

THOMPON KH, GODIN DV, LEE M. (1992) Tissue antioxidant status in itreptozotocin-induced diabetes in rats. Effects of dietary manganese deficiency. *Biol Trace Elem Res* **35**:213-224.

TIMMERMANS PB, CHIU AT, HERBLIN WF, WONG PC, SMITH RD. (1992) Angiotensin II receptor subtypes. *Am J Hypertens.* **5**(6 Pt 1):406-10.

TROCHU, J.N., LEBLAIS, V., RAUTUREAU, Y., BEVERELLI, F., MAREC, H L , BERDEAUX, A., GAUTHIER, C. (1999). beta3-AR Stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol.,* **128**:69-76.

TSUJI, T., OHGA, Y., YOSHIKAWA, Y., SAKATA, S., ABE, T., TABAYASHI, N., KOBAYASHI, S., KOHZUKI, H., YOSHIDA, K.I., SUGA, H., KITAMURA, S., TANIGUCHI, S., TAKAKI, M. (2001). Rat cardiac contractile dysfunction induced by Ca2+ overload: possible link to the proteolysis of alpha-fodrin. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **281(3):** H1286-94.

TSUJINO T, KAWASAKI D, MASUYAMA T. (2006) Left ventricular diastolic dysfunction in diabetic patients: pathophysiology and therapeutic implications.*Am J Cardiovasc Drugs.* **6(4):**219-30.

UUSITTUPA, M I., MUSTONEN, J.N., AIRAKSINEN, K.E. (1990). Diabetic heart muscle disease. *J. Ann. Med.*, **22**:377-386.

VADLAMUDI, R.V.S.V:, RODGERS, R.L., McNEILL, J.H. (1982). The effect of chronic alloxan- and streptozotocin-induced diabetes on isolated rat heart performance. *Can. J. Physiol. Pharmacol.,* **60**:902-911.

VADLEMUDl, R.V.S.V., McNEILL, J.H. (1983). Effect of experimental diabetes on rat cardiac cAMP, phosphorilase and inotropy. *Am. J. Physiol*., **244**:H844.

VAN DER VELDEN J, NAROLSKA NA, LAMBERTS RR, BOONTJE NM, BORBELY A, ZAREMBA R, BRONZWAER JG, PAPP Z, JAQUET K, PAULUS WJ, STIENEN GJ. (2006) Functional effects of protein kinase C-mediated myofilament phosphorylation in human myocardium. *Cardiovasc Res.* **69:** 876-87,

VAN WINKLE, W. (1988). Sarcoplasmic Reticulum in Muscle Physiology. Entman, M. and Van Winkle, W. (ed). CRC Prees Inc, Boca Raton, Florida. 17-47.

VANDER, A.J., SHERMAN, J.H., LUCIANO, D.S. (1994). Human physiology: The mechanism of body function. McGraw Hill. Inc., International Edition.

VIARENGO, A., NICOTERA, P. (1991). Possible role of Ca^{2+} in heavy metal cytotoxicity. *Comp. Biochem. Physiol.***100C(1/2):** 81-84.

WAHLER, G.M. (1997). Cardiac action potentials. In: *Cell Physiology,* Ed.: N. Sperelakis. New York, Academic Press, p.: 780-790

WANG, D.W., KIYOSUE, T., SHIGEMATSU, S., ARITA, M. (1995). Abnormalities of K^+ and Ca^{2+} currents in ventricular myocytes from rats with chronic diabetes. *Am. J. Physiol.* **269:** H1288-H1296.

WEHRENS, X.H., AND MARKS, A.R. (2003). Altered functionand regulation of cardiac ryanodine receptorsin cardiac disease. *Trends Biochem. Sci.* **28**:671–678.

WEIR. G. (1982). Non-insulin dependent diabetes mellitus interplay between beta-cell inadequancy and insulin resistance. *Am. J. Med*., **73**: 461-467.

WETTERFALL, S.F., OLSON, D.R., DeSTEFANO, F., STEVENSON, J.M., FORD. E.S GERMAN, R.R., WILL, J.C., NEWMAN, J.M., SEPE, S.J., VINICOR, F. (1992).

Trends in diabetes and diabetic complications. 1980-1987. *Diabetes Care,* **15**:960-967.

WIER WG, EGAN TM, LOPEZ-LOPEZ JR (1994). Local control of excitation-contraction coupling in rat heart cells. *J Physiol* 474: 463–471.

WOHAIEB SA, GODIN DV. (1987) Alterations in free radical tissue-defence mechanisms in streptozotocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes* **36:**1014-1018.

WOLD LE, CEYLAN-ISIK AF, REN J. (2005) Oxidative stress and stress signaling: menace of diabetic cardiomyopathy. *Acta Pharmacol Sin.* **26(8):**908-17.

WOLFF SP, DEAN RT. (1987) Glucose auto-oxidation and protein modification. The potential role of 'autooxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J* **245:**243-250.

XIN HB, SENBONMATSU T, CHENG DS, WANG YX, COPELLO JA, JI GJ, COLLIER ML, DENG KY, JEYAKUMAR LH, MAGNUSON MA, INAGAMI T, KOTLIKOFF MI, FLEISCHER S: (2002) Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy.*Nature* **416**:334 –338,

XU, Z., ROZANSKI, G.J. (1997). Proton Inhibition of transient outward potassium current in rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29:** 481–490.

XU. Y.J., ELIMBAN, V., TAKEDA, S. (1996). Cardiac sarcoplasmic reticulum function and gene expression in chronic diabetes. Cardiovasc. Pathobiol., 1:89-96.

YAMAMOTO T, YANO M, KOHNO M, HISAOKA T, ONO K, TANIGAWA T, SAIKI Y, HISAMATSU Y, OHKUSA T, MATSUZAKI M. (1999) Abnormal Ca2+ release from cardiac sarcoplasmic reticulum in tachycardia-inducedheart failure. *Cardiovasc Res.* **44(1):**146-55.

YANO M, T. YAMAMOTO T, IKEDA Y, MATSUZAKI M. (2006) Mechanisms of Disease: ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* **3:** 43-52.

YARAŞ N, UĞUR M, ÖZDEMİR S, GÜRDAL H, PURALI N, LACAMPAGNE A, VASSORT G, TURAN B. (2005) Effects of diabetes on ryanodine receptor Ca release channel (RyR2) and Ca2+ homeostasis in rat heart. *Diabetes* **54(11):**3082-8.

YE, G., METREVELI, N.S., REN, J., EPSTEIN, P.N. (2003). Metallothionein prevents diabetes-induced deficits in cardiomyocytes by inhibiting reactive oxygen species production. *Diabetes.* **52:** 777-783.

YOON, J. W, AUSTIN, M., ONODERA, T. (1979). Virus induced diabetes mellitus. lsolation of a virus from the pancreas of child with diabetic ketoacidosis. *N. Eng. J. Mec* 1173-1181.

YOON, J.W., NELEZ, K.A., SMATHERS, P.A. (1983). Virus induced diabetes in autoimmun new zeland mice. *Diabetes***, 32:** 755-782.

YU H, GAO J, WANG H, WYMORE R, STEINBERG S, MCKINNON D, ROSEN MR, COHEN IS. (2000) Effects of the renin-angiotensin system on the current I(to) in epicardial and endocardial ventricular myocytes from the canine heart. *Circ Res.* **86(10):**1062-8.

YU, J.Z., RODRIGUES, B., MCNEIL, J.H. (1997). Intracellular calcium levels are unchanged in the diabetic heart. *Cardiovasc. Res.* **34:** 191-198.

YU, Z., McNEILL, J.H. (1991). Altered inotropic responses in diabetic cardiomyopathy and hypertensive-diabetic cardiomyopathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **257:**64-71.

YUSUF S, OSTERGREN JB, GERSTEIN HC, PFEFFER MA, SWEDBERG K, GRANGER CB, OLOFSSON B, PROBSTFIELD J, MCMURRAY JV; (2005) Candesartan in Heart Failure-Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity Program Investigators. Effects of candesartan on the development of a new diagnosis of diabetes mellitus in patients with heart failure. *Circulation.* **112(1):**48-53.

ZARAIN-HERZBERG, A., YANO, K., ELIMBAN. V., DHALLA, N.S. (1994). Cardiac sarcoplasmic reticulum Ca ATPase expression in STZ induced diabetes. *Biochim , Biophys. Res. Commun.,* **203**:113-120.

ZERKOWSKI. H.R., IKEZONO, K. ROHM, N., REIDEMEISTER, J.C.. BRODDE, O.R. (1986). Human myocardial beta-ARs: Demonstration of both beta1 and beta2- ARs mediating contractile responses to beta- agonists on the isolated right atrium. *Schmiedebergs Arch. Pharmacol.,* **332:**142-147.

ZHU X, BERNECKER OY, MANOHAR NS, HAJJAR RJ, HELLMAN J, ICHINOSE F, VALDIVIA HH. (2005) Increased leakage of sarcoplasmic reticulum Ca2+ contributes to abnormal myocyte Ca2+ handling and shortening in sepsis. *Crit Care Med.* **33(3)**:598-604.

ÖZGEÇMİŞ

I- BİREYSEL BİLGİLER

Adı:	Nazmi
Soyadı:	YARAŞ
Doğum yeri ve tarihi:	Sivas - 22.01.1974
Uyruğu:	T.C.
Medeni durumu:	Evli
İletişim adresi ve telefonu:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
	Biyofizik A.B.D.–0312 3103010/337

II- EĞİTİMİ

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Yüksek Lisansı (1998-2000)

Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (1991-1997)

Bahçelievler Cumhuriyet Lisesi, Ankara (1985-1991)

Bahçelievler Hamdullah Suphi İlköğretim Okulu (1980-1985)

Yabancı dili: İngilizce

III- MESLEKİ DENEYİMİ

Araştırma Görevlisi: Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik ABD (1998-2000).

Araştırma Görevlisi: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik ABD (2001 -)

IV- BİLİMSEL İLGİ ALANLARI

Yayınları:

1) **Yaras N, Bilginoglu A, Vassort G, Turan B.** Restoration of Diabetes-Induced Abnormal Local Ca2+ Release in Cardiomyocytes by Angiotensin II Receptor Blockade. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006 Sep 29; [Epub ahead of print]

2) **Yaras N, Ugur M, Ozdemir S, Gurdal H, Purali N, Lacampagne A, Vassort G, Turan B.** Effects of diabetes on ryanodine receptor Ca release channel (RyR2) and Ca2+ homeostasis in rat heart. Diabetes. 2005 Nov;54(11):3082-8.

3) **Yaras N, Turan B.** Interpretation of relevance of sodium-calcium exchange in action potential of diabetic rat heart by mathematical model. Mol Cell Biochem. 2005 Jan;269(1-2):121-9.

4) **Ayaz M, Ozdemir S, Yaras N, Vassort G, Turan B.** Selenium-induced alterations in ionic currents of rat cardiomyocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Feb 4;327(1):163-73.

5) **Yargicoglu P, Yaras N, Agar A, Gumuslu S, Abidin I, Bilmen S.** Effects of N-nitro l-arginine methyl ester (l-NAME), a potent nitric oxide synthase inhibitor, on visual evoked potentials of rats exposed to different experimental stress models. Acta Physiol Scand. 2004 Mar;180(3):307-16.

6) **Balkan S, Yaras N, Mihci E, Dora B, Agar A, Yargicoglu P.** Effect of donepezil on EEG spectral analysis in Alzheimer's disease. Acta Neurol Belg. 2003 Sep;103(3):164-9.

7) **Yaras N, Yargicoglu P, Agar A, Gumuslu S, Abidin I, Ozdemir S.** Effect of immobilization and cold stress on visual evoked potentials. Int J Neurosci. 2003 Aug;113(8):1055-67.

8) **Yargicoglu P, Yaras N, Agar A, Gumuslu S, Bilmen S, Ozkaya G.** The effect of vitamin E on stress-induced changes in visual evoked potentials (VEPs) in rats exposed to different experimental stress models. Acta Ophthalmol Scand. 2003 Apr;81(2):181-7.

9) **Kucukatay V, Balkan S, Yaras N, Yargicoglu P, Agar A.** The effect of pergolide on cognitive performance of young and middle-aged rats.Int J Neurosci. 2002 Sep;112(9):1027-36.

Seçili Bildiriler:

1) **Yaras N., Ozdemir S., Ugur M., Gurdal H., Puralı N., Lacampagne A., Vassort G., Turan B.** Diabetes-induced alterations in parameters of calcium sparks of cardiomyocytes from rats. 27th Annual ISHR American Section Meeting, May 12-15, New Orleans, USA, Abstract in: J. Mol. Cell. Cardiol. 38 (5), 816, 2005.

2) **Yaras N., Ayaz M., Ozdemir S., Uğur M., Turan B.** Interpretation of relevance of sodium-calcium exchange in action potential of diabetic rat heart by mathematical model. ISHR 24th Annual Scientific Sessions, European Section of the International Society for Heart Research, 2-6 June, 2004 –Dresden, Germany. Abstract in: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 36: A152.

3) **Yaras N, Turan B**. Interpretation of relevance of sodium-calcium exchange in action potential of diabetic rat heart by mathematical model. Mol Cell Biochem. 2005 Jan;269(1-2):121-9.

4) **Yaras N., Ozdemir S., Ugur M., Gurdal H., Puralı N., Lacampagne A., Vassort G., Turan B.** Parameters of calcium sparks are altered in ventricular cardiomyocytes from type 1 diabetic rats. 25th Annual ISHR European Section Meeting, June 21-55, Tromso, Norway, Abstract in: J. Mol. Cell. Cardiol. 38 (6), 1076-1077, 2005.

5) **Turan B, Yaras N, Bilginoglu A, Amber F, Ugur M.** Sex difference affects Ca2+ sparks parameters and β-adrenergic receptor responses in rat heart. 50 th Annual Meeting of American Biophysical Society, Feb. 18-22, 2006, Salt Lake-USA.

V- BİLİMSEL ETKİNLİKLERİ

Projeler

TUBİTAK SBAG – PIA-10 (Yardımcı Araştırmacı)

DPT 2003K12019025-6 (Yardımcı Araştırmacı)

Verdiği Seminerler:

Kalsiyum Kanalları

Hücre Zarı Yüzeyi Elektrik Yükü