TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DENEYSEL TİP 1 DİABETES MELLİTUSTA KALP KASI KALSİYUM HOMEOSTAZİSİ ÜZERİNE ARALIKLI HİPOKSİNİN ETKİSİ

Dr. Ayhan TANYELİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Metin BAŞTUĞ

ANKARA
2013

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DENEYSEL TİP 1 DİABETES MELLİTUSTA KALP KASI KALSİYUM HOMEOSTAZİSİ ÜZERİNE ARALIKLI HİPOKSİNİN ETKİSİ

Dr. Ayhan TANYELİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Metin BAŞTUĞ

ANKARA
2013

Bu tez Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 13B3330002 nolu proje ile desteklenmiştir.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jürisi Tutanağı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan **Deneysel Tip 1 Diabetes Mellitusta Kalp Kası Kalsiyum Homeostazisi Üzerine Aralıklı Hipoksinin Etkisi** başlıklı, Dr. Ayhan TANYELİ'ye ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: /04/2013

Prof. Dr. Metin BAŞTUĞ

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı
Tez Danışmanı

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı
Üye

ÖNSÖZ

Anabilim Dalımızda hipoksi alanında moleküler düzeyde yapılan çalışmaların devamı niteliğindeki tez çalışmamda;

Uzmanlık tezimin oluşmasında yönlendirmeleriyle, sabır ve anlayışıyla ihtiyacım olan her türlü motive edici desteği sağlayan tez danışmanım Prof. Dr. Metin Baştuğ'a,

Tez yazım aşaması sırasında desteklerinden dolayı Prof. Dr. Hakan Fıçıcılar ve Prof. Dr. Demet Tekin'e,

Çalışmalarım süresince öğrettiği teknik, değerli katkılar ve en yoğun olduğu dönemlerde bile yardımlarını esirgemediği için Uzm. Dr. Ali Doğan Dursun'a,

Laboratuvar çalışmalarımda değerli katkılarından dolayı Araş. Gör. Dr. Derya Güzel ve Araş. Gör. Bio. Fırat Akat'a,

Bu süreçte yardımlarını esirgemeyen Esra Uçar, Mina Ardıç, Simge Aykan ve Yiğit Baykara'ya,

Sıkıntılı zamanlarımda manevi desteğiyle hep yanımda olan başta eşim Ülkü Tanyeli olmak üzere tüm aileme,

Bilimsel bilgi birikimimde katkılarından dolayı başta Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Metin Baştuğ olmak üzere tüm hocalarıma, mesai arkadaşlarıma ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamı biricik kızım Merve İrem Tanyeli'ye ithaf ediyorum.

Dr. Ayhan Tanyeli

Nisan, 2013

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay…….i

Önsöz……...ii

İçindekiler…….....iii

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini…….....ix

Şekiller Dizini……....xv

Tablolar Dizini……xvii

1.GİRİŞ……...……1

2.GENEL BİLGİLER……4

2.1.Kalp Kası Ca^{+2} Homeostazisi……...4

2.1.1.Kalp Kasının Yapısı ……..…....4

2.1.2.Kalpte Eksitasyon Kontraksiyon Mekanizması……..4

2.1.2.1.SERCA…….5

2.1.2.1.1.SERCA İzoformları…….....5

2.1.2.1.2.Kalp Gelişimi Sırasında SERCA2a Ekspresyonu……6

2.1.2.1.3.SERCA ve Eksitasyon Kontraksiyon Çiftlenimi…….....7

2.1.2.1.4.Kalp Fizyolojisinde SERCA Pompasının Rolünü Anlamak İçin Transgenik (TG) Yaklaşımlar……...8

2.1.2.1.5.Kardiyak Patofizyoloji Sırasında SERCA2a Düzeylerinin Değişimi……9

2.1.2.2.Fosfolamban……9

2.1.2.2.1.Fosfolamban Ekspresyon ve Fosforilasyonunun Düzenlenmesi.....10

2.1.2.2.2.Fosfolamban Aktivitesinin SERCA Pompası Üzerindeki Etkisi…..….11

2.1.2.2.3.Kontraktiliteyi ve SR'ye Ca^{+2} Taşınmasını İyileştirmek İçin Gen Hedefleri…….12

2.1.2.3.CaMKII……..13

2.1.2.3.1.CaMKII İzoformları……..14

2.1.2.3.2.CaMKII'nin Monomerik Yapısı…….....15

2.1.2.3.3.Otofosforilasyonun Önemi……16

2.1.2.3.4.CaMKII'nin Holoenzim Yapısı……16

2.1.2.3.5.CaMKII'nin Hücresel Yerleşimi……..17

2.1.2.3.6.CaMKII Aktivasyonu: Moleküler Mekanizmalar……..18

2.1.2.3.7.CaMKII Aktivasyonu: Hücresel Mekanizmalar……19

2.1.2.3.8.Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Aracılı CaMKII Aktivitesi…….....21

2.1.2.3.9.Hastalık Durumlarında CaMKII…….22

2.1.2.3.10.Terapötik Hedef Olarak CaMKII İnhibisyonu…….……23

2.1.2.4.L Tipi Ca^{+2} Kanalı……24

2.1.2.5.Riyanodin Reseptörü……24

2.1.2.6.Na^{+}/Ca^{+2} Değiş Tokuşturucusu (NCX)……25

2.2.Diabetes Mellitus……26

2.2.1.Tip 1 ve Tip 2 Diabetes Mellitus……..……...26

2.2.1.1.Tip 1 Diabetes Mellitus……26

2.2.1.1.1.Tip 1 Diabetes Mellitus Fizyopatolojisi, Etiyolojisi ve Genel Özellikleri……...26

2.2.1.1.2.Tip 1A Diabetes Mellitus……...27

2.2.1.1.3.Tip 1B Diabetes Mellitus…….....27

2.2.1.2.Tip 2 Diabetes Mellitus…….27

2.2.1.2.1.Tip 2 Diabetes Mellitus Fizyopatolojisi, Etiyolojisi ve Genel Özellikleri……...27

2.2.1.2.1.1.İnsülin Direnci…….27

2.2.1.2.1.2.İnsülin Sekresyonunda Azalma…….27

2.2.2.Diabetes Mellitus Önemi, Prevalansı ve Mortalitesi…….....30

2.2.3.Diabetes Mellitus Tanısı……..31

2.2.4.Diyabet Komplikasyonları...……...32

2.2.4.1.Akut Komplikasyonlar…….32

2.2.4.1.1.Diyabetik Ketoasidoz……...……..32

2.2.4.1.2.Hiperozmolar Hiperglisemik Durum…….…….....32

2.2.4.1.3.Ciddi Hipoglisemi ve Nöroglikopeni……..……..32

2.2.4.1.4.Laktik Asidoz……..……...33

2.2.4.1.5.Bakteri/Mantar Enfeksiyonları.……...33

2.2.4.2.Kronik Komplikasyonlar…….33

2.2.4.2.1.Mikroanjiyopati…….33

2.2.4.2.1.1.Diyabetik Retinopati…….....33

2.2.4.2.1.2.Diyabetik Nöropati……..34

2.2.4.2.1.3.Diyabetik Nefropati……34

2.2.4.2.1.4.Diyabetik Ayak Ülserleri……35

2.2.4.2.2.Makroanjiyopati……35

2.2.4.2.2.1.Kardiyovasküler Hastalıklar…….....35

2.2.4.2.2.1.1.Diyabetik Kardiyomiyopati……36

2.2.5.Diyabetik Kardiyomiyopati Fizyopatolojisi……..36

2.2.6.Streptozotosin ile Deneysel Tip 1 Diabetes Mellitus Oluşturulması……...40

2.3.Hipoksi……43

2.3.1.Yüksek İrtifada İnspirasyon Havası PO_2 Değişiklikleri……..…44

2.3.2.Hipoksi Çeşitleri……...44

2.3.2.1.Akut Hipoksi……44

2.3.2.2.Aralıklı Hipoksi……45

2.3.2.3.Kronik Hipoksi……..46

2.3.3.Hipoksik Ön Koşullandırma……...46

2.3.3.1.Hipoksik Ön Koşullandırma ve HIF (Hipoksiyle İndüklenen Faktör)…46

2.3.4.İskemik Ön Koşullandırma……47

2.3.5.AH ve Ca^{+2} Homeostazisi……48

3.GEREÇ VE YÖNTEM……..49

3.1.Deney Hayvanları……....49

3.2.Deney Grupları……....49

3.3.Dokuların Alınması……51

3.4.Dokuların Homojenizasyonu ve Total RNA Eldesi……51

3.4.1.Kullanılan Gereç ve Kimyasallar……...51

3.4.2.Ön Hazırlık Basamakları……53

3.4.3.Homojenizasyon ve Total RNA Eldesi Basamakları……53

3.5.Total RNA Konsantrasyonu Ölçümü ve Kalitesinin Kontrolü……..54

3.6.Komplementer Deoksiribonükleik Asit (cDNA) Sentezi…….56

3.6.1.RT-PCR İçin Kullanılan Gereç ve Kimyasallar……...57

3.6.2.Ön Hazırlık Aşaması…….....58

3.6.3.RT-PCR Aşamaları……..58

3.7.PLB, CaMKII, GAPDH Polimeraz Zincir Reaksiyonları……...59

3.7.1.PCR İçin Kullanılacak Gereç ve Kimyasallar……...61

3.7.2.Ön Hazırlık Aşaması…….....62

3.7.3.PCR Aşamaları…….63

3.7.3.1.PLB PCR Protokolü…….63

3.7.3.2.CaMKII PCR Protokolü…….....64

3.7.3.3.GAPDH PCR Protokolü…….....65

3.8.PLB, CaMKII, GAPDH Ürünlerinin Jel Elektroforezi ve Görüntülenmesi…….66

3.8.1.Jel Elektroforezi İçin Kullanılacak Gereç ve Kimyasallar……..66

3.8.2.Jel Elektroforezi Aşamaları……67

3.8.3.Agaroz Jel Görüntülenmesi ve Ölçümleri…….....68

3.9.İstatistiksel Analizler……..70

4.BULGULAR……..71

4.1.Deney Hayvanlarinin Deney Başlangıcı ve Sonundaki Ağırlık Sonuçları……71

4.2.Deney Hayvanlarinin Deney Başlangıcı ve Sonundaki Kan Glukoz Sonuçları……73

4.3.PLB Sonuçları……75

4.4.CaMKII Sonuçları……..76

5.TARTIŞMA……77

6.SONUÇLAR……...83

ÖZET……85

SUMMARY……...87

KAYNAKLAR……..89

EKLER……128

EK 1.Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı……....128

EK 2.GAPDH Primer Kalite Sertifikası……...130

EK 3.PLB Primer Kalite Sertifikası….……131

EK 4.CaMKII Primer Kalite Sertifikası.……..132

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%: Yüzde

°C: Santigrat Derece

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

A.Ü.: Ankara Üniversitesi

A°: Angstrom

A230: 230 nm Dalga Boyundaki Absorbans

A260: 260 nm Dalga Boyundaki Absorbans

A280: 280 nm Dalga Boyundaki Absorbans

ABCC8: ATP Binding Cassette C8

ADA: American Diabetes Association, Amerikan Diyabet Derneği

ADP: Adenozindifosfat

AGE: İleri Glikasyon Ürünü

AH: Aralıklı Hipoksi

Akita Fare: Non-Obez Mutant Fare

APS: Aksiyon Potansiyeli Süresi

ATII: Anjiyotensin II

ATP: Adenozintrifosfat

BB: BioBreeding Sıçan

BKİ: Beden Kitle İndeksi

Ca^{+2}: Kalsiyum İyonu

CaM: Kalmodülin

CaMKII: Ca^{+2} Kalmodülin Bağımlı Protein Kinaz II

cDNA: Komplementer Deoksiribonükleik Asit

CEL: Karboksil Ester Lipaz

COOH: Karboksil Terminali

COX-2: Siklooksijenaz-2

DAD: Artdepolarizasyon

dATP: Deoksiadenozintrifosfat

db/db Fare: Leptin Reseptör Gen Defekti

dCTP: Deoksisitozintrifosfat

dGTP: Deoksiguanintrifosfat

DIDMOAD Sendr.: Diabetes İnsipidus, Diabetes Mellitus, Optik Atrofi ve Sağırlık ile Seyreden Sendrom (Wolfram Sendromu)

DKA: Diyabetik Ketoasidoz

DKMP: Diyabetik Kardiyomiyopati

dl: Desilitre

DM: Diabetes Mellitus

DM+AH: Diabetes Mellitus + Aralıklı Hipoksi

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DNase: Deoksiribonükleaz

dNTP: Deoksinükleotidtrifosfat

dTTP: Deoksitimintrifosfat

EAD: Erken Artdepolarizasyon

ECC: Eksitasyon Kontraksiyon Çiftlenimi

EDTA: Etilen Diamin Tetraasetik Asit

EPO: Eritropoetin

FFA: Serbest Yağ Asidi

g: Yer Çekimi İvmesi

GAPDH: Gliseraldehit3-Fosfat Dehidrogenaz

GK: Goto-Kakizaki Sıçanı

GLUT: Glukoz Taşıyıcısı

gr: Gram

H_2O_2: Hidrojen Peroksit

HbA1c: Glikozile Hemoglobin

HIF: Hipoksi ile İndüklenen Faktör

HIV: İnsan İmmun Yetmezlik Virüsü

HNF: Hepatosit Nükleer Faktör

HO-1: Hem Oksijenaz-1

HRE: Hipoksi Yanıt Elemanı

I/R: İskemi-Reperfuzyon

I_{Ca}: Ca^{+2} akımı

I_{Na}: Na^{+} akımı

IPF-1: İnsülin Promotor Faktör-1

i.p.: İntraperitoneal

iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

K: Kontrol

KAH: Koroner Arter Hastalığı

KCNJ11: Potassium İnwardly-Rectifying Channel J11

kDa: Kilodalton

kg: Kilogram

KLF11: Kruppel Like Factor 11

KN93: CaMKII İnhibitörü

kPa: Kilopascal

KY: Kalp Yetmezliği

LDH: Laktat Dehidrogenaz

LTCC: L Tipi Ca^{+2} Kanalı

LV: Sol Ventrikül

m: Metre

MDa: Megadalton

mEq: Miliekivalan

Met^{281}: $Metionin^{281}$

mg: Miligram

$MgCl_2$: Magnezyum Klorit

MIT: Mitokondri

miRNA: MikroRNA

ml: Mililitre

mM: Milimolar

MODY1-10: Gençlerde Görülen Erişkin Tipi Diyabet Formları (Maturity Onset Diabetes of The Young 1-10)

mRNA: Mesajcı RNA

Na^+: Sodyum İyonu

NAD^+: Nikotinamid Adenin Dinükleotid

NCX: Na^+/Ca^{+2} Değiş Tokuşturucusu

NeuroD1: Nörojenik Diferansiyasyon1

ng: Nanogram

NH_2: Amino Terminali

nm: Nanometre

NO: Nitrik Oksit

NOD: Non-Obez Diyabetik

O_2: Oksijen

ob/ob fare: Leptin Gen DefektliTip 2 DM Modeli

OH^-: Hidroksil İyonu

ONOO: Aşırı Toksik Olan Peroksinitrat

OVE 26: β Hücrelerinde Kalmodulin Aşırı Ekspresyonu Olan Sıçan Modeli

$PaCO_2$: Arter Kanı Parsiyel Karbondioksit Basıncı

PAO_2: Alveolar Parsiyel Oksijen Basıncı

PaO_2: Arter Kanı Parsiyel Oksijen Basıncı

PARP: Poli (ADP-riboz) Polimeraz

PAX4: Paired Box4;

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCr: Total Fosfokreatin

PDH: Pirüvat Dehidrogenaz

PKA: Protein Kinaz A

PKC: Protein Kinaz C

PLB: Fosfolamban

pmol: Pikomol

PP: Protein Fosfataz

PPAR: Peroksizom Proliferatör Aktivatör Reseptör

RAAS: Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi

RNA: Ribonükleik Asit

RNase free: Ribonükleazdan Arındırılmış

RNase: Ribonükleaz

ROS: Serbest Oksijen Türleri

rpm: Dönüş/Dakika

rRNA: Ribozomal RNA

RTase: Ters (Revers) Trankriptaz

RT-PCR: Revers Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RyR: Riyanodin Reseptörü

scaRNA: Küçük Kajal RNA

Ser^{16} : Serin^{16}

SERCA: Sarkoplazmik Endoplazmik Retikulum Ca^{+2} ATPaz

siRNA: Küçük İnterferans RNA

snoRNA: Küçük Nükleolar RNA

snRNA: Küçük Nükleer RNA

SR: Sarkoplazmik Retikulum

STZ: Streptozotosin

Taq DNA polimeraz: Yüksek Sıcaklığa Dayanıklı Polimeraz Enzimi

TBE: TrisborikasitdisodiumEDTA

TG: Transgenik

Thr^{17}: Treonin^{17}

TNF-α: Tümör Nekroz Faktör-α

tRNA: Transfer RNA

u: Ünite

UV: Ultraviyole

VEGF: Damar Endoteli Büyüme Faktörü

V_{max}: Maksimum Hız

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

WT: Yabani Tip

X ± SD: Ortalama ± Standart sapma

XOD: Ksantin Oksidaz

ZDF: Zucker Diyabetik Fatty Rats

ZF/ZDF: Zucker Fatty/Zucker Diyabetik Fatty Rat

β-ME: β-Merkaptoetanol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Eksitasyon Kontraksiyon Çiftlenimi **7**

Şekil 2.2. CaMKII ve PKA Tarafından PLB'nin Fosforilasyonu **10**

Şekil 2.3. SERCA ve PLB Etkileşimi **10**

Şekil 2.4. CaMKIIδ İzoformları **14**

Şekil 2.5. CaMKII'nin Fosforilasyonu ve Oksidasyonu **15**

Şekil 2.6. CaMKII'nin Holoenzim Yapısı **17**

Şekil 2.7. Kalmodülinin Yapısı **18**

Şekil 2.8. Aksiyon Potansiyeli ve CaMKII Aktivitesi **20**

Şekil 2.9. ROS ve CaMKII İlişkisi **21**

Şekil 2.10. Aşırı CaMKII Artışı Sonucu KY Gelişmesi **23**

Şekil 2.11. PKA ve CaMKII Tarafından Ser^{2809} ve Ser^{2815} Bölgelerinden RyR'nin Fosforile Edilmesi **25**

Şekil 2.12. DKMP'nin Patofizyolojik Mekanizmaları **39**

Şekil 2.13. STZ'nin Pankreas β Hücresi Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Mekanizması **41**

Şekil 2.14. I/R karşısında HIF ve Etkilediği Moleküllerin Etkileri **47**

Şekil 3.1. Total RNA'ların Elde Edildiği Spektrofotometre (NanoDrop, ND-1000) **55**

Şekil 3.2. 28S ve 18S RNA Bantları **56**

Şekil 3.3. PCR Siklusları **60**

Şekil 3.4. PCR Cihazı (Thermocycler, Techne TC-412) **63**

Şekil 3.5. UV Kamera (Cleaver Scientific, DI-HD) **68**

Şekil 3.6. CaMKII, GAPDH Agaroz Jel Görüntüleri **69**

Şekil 3.7. PLB, GAPDH Agaroz Jel Görüntüleri **69**

Şekil 4.1. Deney Hayvanlarının Deney Başlangıcı ve Sonundaki Ağırlık Artış Oranları **72**

Şekil 4.2. Deney Hayvanlarının Deney Sonu Ağırlık Ortalamaları **72**

Şekil 4.3. Deney Hayvanlarının Deney Sonu Kan Glukoz Düzeyleri **74**

Şekil 4.4. Deney Hayvanlarının Deney Başlangıcı ve Sonundaki Kan Glukoz Düzeyleri Arasındaki Artış Oranları **74**

Şekil 4.5. PLB/GAPDH Sonuçları **75**

Şekil 4.6. CaMKII/GAPDH Sonuçları **76**

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. SERCA İzoformları **6**

Tablo 2.2. Diabetes Mellitusun Etiyolojik Sınıflandırılması **29**

Tablo 2.3. 2000 Yılındaki DM Vakalarının ve 2030'da Tahmin Edilen DM Vakalarının Ülkelere Göre En Yüksek Sayısal Değerleri **30**

Tablo 2.4. Tip 1 ve Tip 2 Diyabetik Kemirgen Modellerinde Gözlenen Anormallikler **42**

Tablo 2.5. Tip 1 ve Tip 2 Diyabetik Kemirgen Modellerinde Gözlenen Kardiyak Anormallikler **43**

Tablo 2.6. Yükseklik Artışıyla Beraber İnspirasyon Havası PO_2 (mmHg) Değişiklikleri **44**

Tablo 3.1. Deney Grupları, Denek Sayıları ve Laboratuvara Geliş Ağırlıkları **50**

Tablo 3.2. PLB, CAMKII, GAPDH İçin Primer Dizinler, Hedef DNA Dizini ve Nükleotid Sayısı **61**

Tablo 4.1. Deney Hayvanlarının Deney Başlangıcı ve Deney Sonundaki Ağırlık Değerleri ve Ağırlık Artış Oranları **71**

Tablo 4.2. Deney Hayvanlarının Deney Başlangıcı ve Sonundaki Kan Glukoz Düzeyleri ve Artış Oranları **73**

Tablo 4.3. PLB/GAPDH Sonuçları **75**

Tablo 4.4. CaMKII/GAPDH Sonuçları **76**

1.GİRİŞ

Dünyadaki önemli sağlık problemlerinden biri olan diabetes mellitus (DM); hiperglisemi ile karakterize, insülin sekresyonu, insülin etkisi veya her ikisinde de defekt olan metabolik hastalıklar grubudur. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre 2000 yılında DM hasta sayısının dünyada 171.000.000, Türkiye'de 2.920.000 iken, 2030 yılında dünyada 366.000.000 Türkiye'de 6.422.000 olması beklenmektedir (1, 2).

DM'nin akut ve kronik komplikasyonları bulunmaktadır. Ateroskleroz, koroner arter hastalığı (KAH), miyokard enfarktüsü, serebrovasküler hastalık, hipertansiyon ve diyabetik kardiyomiyopati (DKMP) gibi kardiyovasküler komplikasyonlar diyabete bağlı morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerindendir (3, 4).

Önemli komplikasyonlardan biri olan DKMP, KAH veya hipertansiyondan bağımsız olup, sistolik disfonksiyon gelişiminden önce oluşan diyastolik disfonksiyon ile karakterizedir (3, 4, 5). DKMP'nin ilerleyen safhasında kalp yetmezliği (KY) gelişmektedir (4). Framingham ve ark. (6) tarafından yapılan çalışmada diyabetiklerde KY insidansının erkeklerde iki, kadınlarda beş kat yüksek olduğu gösterilmiştir.

Pankreas β hücresi için toksik olan streptozotosin (STZ) ile deneysel olarak Tip 1 DM oluşturulan ratlarda DKMP gelişmektedir (7, 8, 9). DM oluştuktan yaklaşık 5 hafta sonra kontraktil disfonksiyonun başladığı, 6. haftada disfonksiyonun tamamen gözlemlenebildiği rapor edilmiştir (8, 9).

DKMP oluşumuna neden olan mekanizmalardan biri kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) homeostazisindeki bozulmadır. STZ ile oluşturulan DM modelinde kalp kası SERCA (sarko/endoplazmik retikulum Ca^{+2}-ATPaz), PLB (fosfolamban) ve CaMKII (Ca^{+2}-kalmodülin bağımlı protein kinaz II) mRNA ve protein seviyelerinde değişikliklerin olduğu rapor edilmiştir. DKMP'de PLB ve SERCA

mRNA ve protein düzeyleri ile ilgili farklı sonuçlara rastlanmaktadır. Bazı çalışmalarda diyabetik kalplerde PLB mRNA ve protein seviyelerinin arttığını (10, 11), farklı çalışmalarda PLB protein seviyelerinin özellikle aktif form olan fosforile PLB miktarının azaldığını (12-14), SERCA protein seviyelerinin daha belirgin azalıp PLB/SERCA oranının arttığını (11, 13) gösteren çalışmalar mevcuttur. PLB'nin fosforillenmesini sağlayan temel proteinlerden olan CaMKII aktivitesinin diyabetik kalplerde arttığı bildirilmiştir (12, 13, 15). CaMKII aktivitesindeki artışa rağmen PLB'nin fosforilasyonundaki azalma, PLB'nin fosforilasyonunu azaltan protein fosfatazdaki (PP) artışa veya PLB proteinindeki azalışa bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (12, 13). Azalmış PLB fosforilasyonu SERCA aktivasyonunda da azalmaya neden olmaktadır (16, 17). DM'de SERCA2a mRNA ve protein seviyelerindeki % 30'luk azalmanın (9, 11-13) Ca^{+2}'nin SR'ye yetersiz pompalanması ve sitozolde aşırı birikimi ile diyastolik disfonksiyon gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (18).

Peru'da yapılan bir çalışmada deniz seviyesinden 150 m yüksekteki Lima ve 4.360 m yükseklikteki Cuzco'da yaşayanların DM prevalansı hesaplanmıştır. Lima'da prevalans, % 1,6 iken Cuzco'da % 0,4 olarak bulunmuştur (19).

Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda aralıklı ve kronik hipoksinin kalpte infarkt alanını azalttığı, iskemi sonrası kardiyak fonksiyonlarda iyileşme sağladığı gösterilmiştir (20). Yapılan çalışmalara göre; aralıklı hipoksinin (AH) hipertrofiden bağımsız olarak sol ventrikül (LV) kontraktilitesini arttırdığı (21), infarkt sonrası ventriküler aritmi insidansını azalttığı (22), diyastol sonu fonksiyon ve hacmini düzelterek miyokardı reperfüzyon hasarından koruduğu rapor edilmiştir (23, 24). Anabilim Dalımızda yapılan deneysel bir çalışmada STZ ile indüklenen Tip 1 DM'ye Bağlı LV Fonksiyon Bozukluğunda AH'nin DM gruplarında fonksiyonel iyileşme gösterdiği bulunmuştur (25).

İskemi-reperfüzyon (I/R) ile indüklenen kardiyak disfonksiyon çalışmalarında, AH uygulamasının CaMKII aktivitesini, PLB fosforilasyonunu (26) ve SR'ye Ca^{+2} pompalama aktivitesini arttırdığı (27) gösterilmiştir. Bu sonuçlar I/R modelinde

AH'nin kalbi koruyucu etkisine CaMKII'nin PLB'yi fosforile ederek aracılık ettiğini düşündürmektedir.

Kalp kası Ca^{+2} homeostazisi ile ilgili çalışmalar, AH'nin DKMP gelişiminin engellenmesi ve/veya erken gelişim aşamalarında hastalığın ilerlemesinin yavaşlatılması ile sistolik disfonksiyon ve KY gelişim riskini; DM'nin kardiyovasküler komplikasyonlara bağlı mortalite oranını azaltabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmada AH uygulaması ile DKMP gelişimindeki moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması ve DM'ye bağlı kardiyak komplikasyonların engellenmesinde önleyici ve tedavi edici planlamaların oluşturulmasına katkı sağlanması amaçlandı.

Hipotez 1: STZ ile indüklenen DKMP'de AH, PLB mRNA düzeyini arttırır.

Hipotez 2: STZ ile indüklenen DKMP'de AH, CaMKII mRNA düzeyini arttırır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Kalp Kası Ca^{+2} Homeostazisi

2.1.1.Kalp Kasının Yapısı

Kalp kası birbirine bağlı miyokard hücrelerinden oluşur. Kardiyomiyositler kalpteki tüm hücrelerin 1/3'ünü, miyokardın toplam hacminin % 75'ini oluşturur. Ventriküler miyosit hacminin yaklaşık yarısı miyofibrillerle, 1/3 ile 1/4 kadarı da mitokondrilerden oluşmaktadır. Miyofibriller kollajen bağ dokusu ile sarılıdır ve birbirlerine tutunurlar (28).

Kardiyomiyositler çizgili kas olduğu halde, iskelet kaslarından farklı olarak kendi aralarında özel bağlantı elemanları içerirler. Gedik-kavşak (gap-junction) denilen ve hücreler arası yüksek geçirgenliğe sahip olan bağlantı elemanları, hem komşu hücrelerle mekanik bağlantıyı, hem de iyonik akımların ve küçük moleküllerin iletimini sağlarlar. Bu sayede kalbe herhangi bir yerinden gelen uyarı, tüm kalbe kolayca yayılır ve miyositler topluca kasılırlar (29).

2.1.2.Kalpte Eksitasyon Kontraksiyon Mekanizması

Kalbin pompalama işlevini yerine getirmesi, sarkolemmanın elektriksel olarak uyarılmasıyla başlayıp hücrenin kasılmasıyla son bulan olaylar zinciri ile gerçekleşmektedir. Eksitasyon kontraksiyon çiftlenimi (ECC), aksiyon potansiyeli sarkolemmayı depolarize ettiği zaman başlar. Kasılma fonksiyonu hücre içi serbest Ca^{+2} konsantrasyonunun artmasıyla gerçekleşir (30). Kalpte aksiyon potansiyelinin plato fazında sarkolemmadaki voltaj bağımlı L tipi Ca^{+2} kanalları (LTCC) yoluyla hücre içine Ca^{+2} girer. Ca^{+2} girişi, sarkoplazmik retikulum (SR) membranında bulunan riyanodin reseptörleri (RyR) aracılığıyla SR depolarından daha fazla Ca^{+2} salınmasını tetiklemektedir (31, 32). Kasılmanın başlaması, hücre içi Ca^{+2}

konsantrasyonunun hızla 10-100 kat artmasıyla olur (30). Artan hücre içi Ca^{+2} miyofilamentlere bağlanarak miyosit kontraktilitesini sağlar. Gevşeme fazında sitozolik Ca^{+2} SR içine pompalanarak uzaklaştırılır. Sıçanlarda bunun % 92'sinin SERCA aracılığıyla gerçekleştirildiği gösterilmiştir (32, 33). Kardiyak SR'de bulunan küçük bir fosfoprotein olan PLB SERCA aktivasyonunu düzenlemektedir (31, 34). Defosforile PLB, SERCA'yı inhibe ederken, PLB CaMKII tarafından fosforillendiğinde SERCA inhibisyonu ortadan kalkıp SR içine Ca^{+2} pompalanması artmaktadır (34). CaMKII, kalpte Ca^{+2} homeostazisinde en önemli düzenleyicilerden biri olup SERCA, PLB gibi SR proteinlerini fosforillemektedir (26, 35).

2.1.2.1.SERCA

Bir izoformu olan SERCA2a miyokardiyal kontraktilitede merkezi bir rol oynar. SERCA2a SR içine Ca^{+2} taşır, sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunu, SR Ca^{+2} yükünü ve kalbin kasılma ve gevşeme hızını düzenler. İnsan ve tavşanlarda SERCA, sitoplazmik Ca^{+2} 'nin pompalanması işleminin % 70'inden, farelerde ve sıçanlarda % 90'ından sorumludur (36).

2.1.2.1.1.SERCA İzoformları

SERCA'nın 1, 2 ve 3 ana izoformlar olmak üzere, alt üniteleriyle birlikte en az 10 izoformu tanımlanmıştır (37-44, Tablo 2.1).

SERCA1a [(994 aminoasitli -aa-, erişkin iskelet kası) ve 1b (1011 aa, fötal iskelet kası)] hızlı kasılan iskelet kaslarında gösterilmiştir (38, 39).

SERCA2a (997 aa) en çok kalpte gösterilmiştir ve yavaş kasılan iskelet kasında da bulunmaktadır (43, 44). SERCA2b (1042 aa) kas ve kas dışı bütün dokularda düşük düzeylerdedir (40-42). SERCA2c (999 aa) kalp kasında bulunduğu bildirilmiştir (45).

İnsanlarda SERCA3'ün çeşitli doku ve hücre tiplerinde eksprese edilen 6 farklı izoformu (3a–3f, 999–1052 aa) bilinmektedir (46-48). SERCA3 izoformları hemapoetik hücrelerde, trombositlerde, epitel hücrelerinde, fibroblastlarda ve endotel hücrelerinde yüksek düzeylerde gösterilmiştir (46, 47, 49, 50).

Tablo 2.1. SERCA İzoformları (51)

Memeli Dokularında SERCA İzoformlarının Dağılımı								
	İskelet Kası				Kalp Kası		Düz Kas	Kas Dışı Hücre
	Hızlı Kasılma		Yavaş Kasılma					
SERCA İzoformları	Fetal	Erişkin	Fetal	Erişkin	Fetal	Erişkin		
SERCA1a	-	+++++	-	-	-	-	-	-
SERCA1b	+++	-	-	-	-	-	-	-
SERCA2a	+	-	+	+++	+	++++	+	-
SERCA2b	+	+	+	+	+	+	+	+
SERCA3a	-	-	-	-	-	-	-	+
SERCA3b	-	-	-	-	-	-	-	+
SERCA3c	-	-	-	-	-	-	-	+

2.1.2.1.2.Kalp Gelişimi Sırasında SERCA2a Ekspresyonu

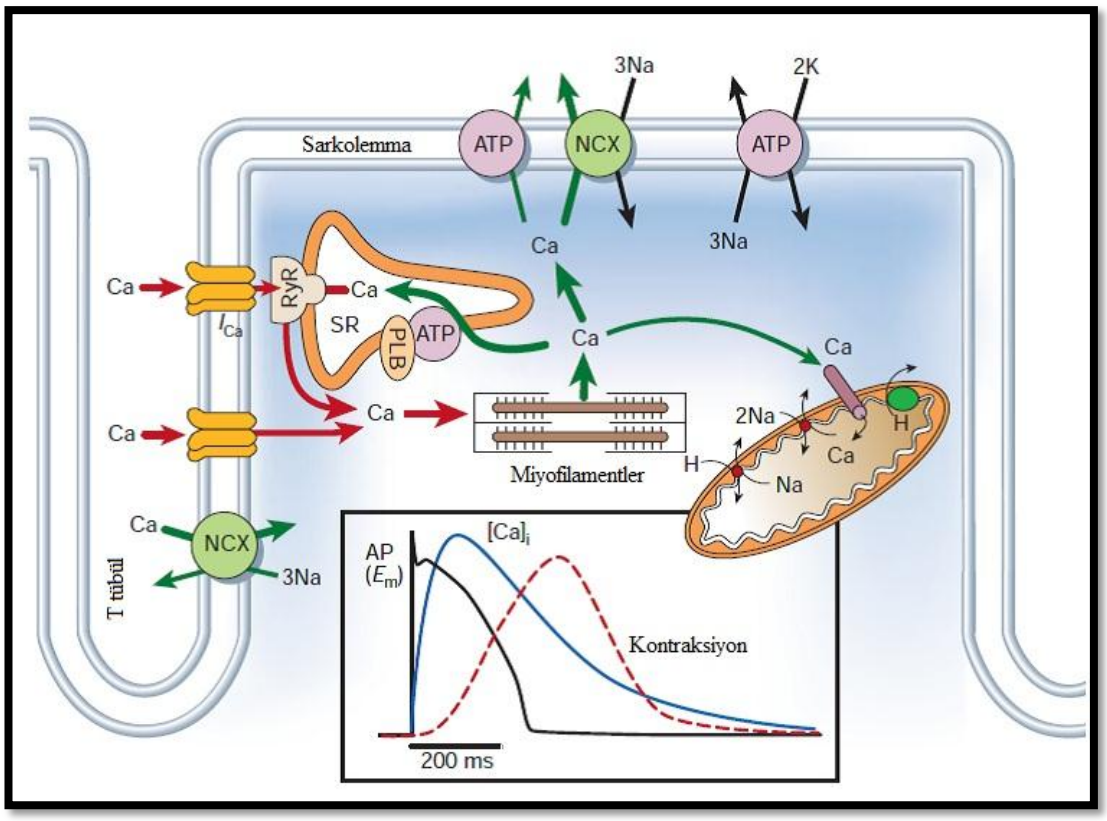
Kalp gelişimi sırasında, fonksiyonel SR gelişiminden önce kalp tüpünde SERCA2a (postkoital 10. gün) eksprese olur ve kalp gelişimi boyunca SERCA2a seviyesi birkaç kat artar. Erişkin kalbinde SERCA2a, SR membranında en bol bulunan predominant izoformdur (52-55). Neonatal ventrikül ile karşılaştırıldığında, yetişkin kalbinde gevşeme zamanının daha kısa olması SERCA pompasındaki postnatal artışa bağlıdır (56). SERCA2a ekspresyon seviyelerinde ventrikül ile atriyum arasında farklılıklar vardır. Kemirgenlerde SERCA2a protein düzeyi ventriküle oranla atriyumda yaklaşık iki kat daha yüksektir (57, 58). Ventriküle kıyasla atriyumda daha kısa kasılma süresi atriyumdaki daha yüksek SERCA düzeylerini açıklayabilir (59).

SERCA2a ekspresyon düzeyleri yaşlanma ile değişmektedir. Hem SERCA2a içeriğinde hem de aktivitesinde azalma, yaşlanmış hayvan modellerinde ve yaşlı insan miyokardında rapor edilmiştir (54, 60-63). Yaşlanan sıçan kalplerinde, SERCA

seviyelerinde (% 30-40) ve aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Bu azalma, uzamış kasılma zamanı ve azalmış miyokard fonksiyonu ile ilişkili bulunmuştur. Benzer şekilde, yaşlı insan miyokardında SERCA2a protein düzeyleri önemli ölçüde azalmış olarak bulunmuştur (62).

2.1.2.1.3.SERCA ve Eksitasyon Kontraksiyon Çiftlenimi

Kardiyak SR sadece Ca^{+2} salınması için bir Ca^{+2} deposu olarak değil, aynı zamanda kasılma-gevşeme sırasında aktif olarak sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunu korumada da görev almaktadır. ECC (Şekil 2.1) sırasında serbest sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonu, kas kasılma derecesini ve kuvvet gelişimini belirler. SERCA ve sarkolemmal Ca^{+2} taşıyıcıları tarafından sitozolik Ca^{+2}'nin taşınması kas gevşemesi ile sonuçlanır. Gevşeme hızı büyük ölçüde SERCA2a tarafından SR içine Ca^{+2} geri alınması ile belirlenir (64-67).



Şekil 2.1. Eksitasyon Kontraksiyon Çiftlenimi (36)

2.1.2.1.4.Kalp Fizyolojisinde SERCA Pompasının Rolünü Anlamak İçin Transgenik Yaklaşımlar

Artmış SERCA düzeylerinin kalp fonksiyonuna faydalı olup olmadığını anlamak için, SERCA pompasının yüksek düzeyde eksprese edildiği transgenik (TG) hayvan modelleri geliştirilmiştir. Aşırı eksprese olan SERCA2a veya SERCA1a TG fare modelleri üzerinde yapılan çalışmalar, SERCA aşırı ekspresyonunun artmış Ca^{+2} taşınması ve kontraktilitesi ile sonuçlandığını göstermiştir (65, 66, 68-71). İskelet kası izoformu olan SERCA1a'nın aşırı eksprese edildiği TG fare kalpleri ile TG olmayan kalpler karşılaştırıldığında, SERCA pompasının 2,5 kat fazla olduğu gösterilmiştir (72). Ancak, bu farelerdeki endojen SERCA2a seviyeleri yarıya düşmüştür. Bu durum proteinlerin SR membranına yerleşmesinde bir sınır olduğunu düşündürmüştür. SERCA seviyeleri yüksek olan farelerde normal kalp fonksiyonu gözlenmiştir ve kardiyak patolojiye rastlanmamıştır, kalp kasılma, gevşeme hızları ve SR Ca^{+2} taşınması daha fazla bulunmuştur (65, 66, 68-72). Bu çalışmalar birlikte ele alındığında, artmış SERCA ekspresyonun iyi tolere edilebildiğini ve SERCA düzeylerinin azaldığı KY gibi durumların tedavisinde kullanılabilir olduğunu göstermektedir. SERCA2 geni baskılanmış bir fare modeli, azalmış SERCA ekspresyonunun etkisini incelemek için geliştirilmiştir (73-75). Her iki allelin bozulması öldürücüdür ve homozigot yoksun (SERCA2-/-) fareler gelişim sırasında erkenden ölürler. Heterozigot (SERCA2-/+) fareler uzun süre yaşarlar ve belirgin bir kalp patolojisi göstermezler. SERCA2-/+ farelerde düşük SERCA2 seviyeleri [yabani tip (WT) kalplerin yüzde % 65'i] gösterilmiş olsa da, bu farelerde Ca^{+2} homeostazisinin korunduğu ve β-adrenerjik uyarılmaya yanıt alındığı gösterilmiştir (73, 74). Aşırı basınç yüküne maruz kalan SERCA2-/+ farelerde WT kontrollere göre, KY gelişimi daha hızlıdır (76). SERCA2a'dan yoksun SERCA2b izoformunun eksprese edildiği fare modeli geliştirilmiştir (77). Bu farelerde ciddi yapısal ve işlevsel anormallikler ve kardiyomiyopati gelişmektedir. Bu nedenle, TG ve geni baskılanmış hayvan modelleri kullanılarak yapılan çalışmalar, SERCA pompa seviyesinin SR'ye Ca^{+2} geri alınma fonksiyonunda anahtar rol oynadığını ve seviyesindeki değişikliklerin kontraktiliteyi değiştirebileceğini kanıtlamıştır (65).

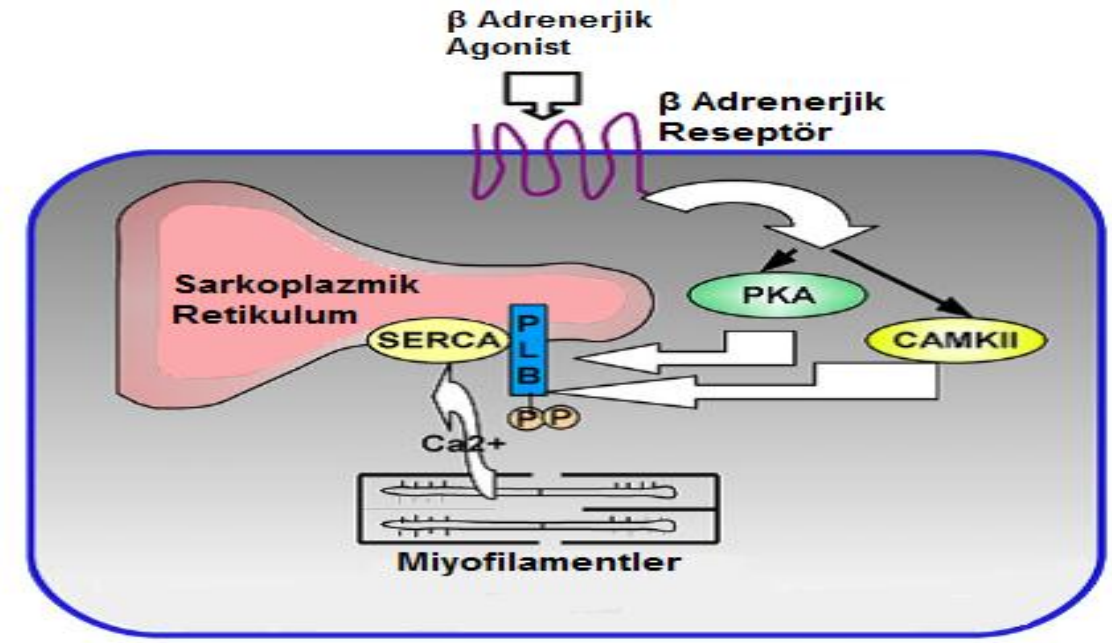
2.1.2.1.5.Kardiyak Patofizyoloji Sırasında SERCA2a Düzeylerinin Değişimi

SERCA2a, Ca^{+2} taşınması ile kas gevşemesi ve SR Ca^{+2} depolarını korumaktan sorumludur. SERCA ekspresyon ve aktivitesi, deneysel hayvan modelleri ve KY olan insan kalp dokuları kullanılarak her iki KY'de de kapsamlı olarak çalışılmıştır. Bu çalışmalar SR'ye Ca^{+2} taşınmasının, KY'de azalmış olduğunu göstermiştir (37, 65).

KY olan insan kalplerinde; SERCA2a mRNA ve protein düzeyleri azalmış olarak bulunmuştur (37, 65, 78, 79). Bazı çalışmalarda, SR Ca^{+2} taşınma fonksiyonundaki azalmaya rağmen, SERCA2a ekspresyon seviyelerinin değişmemiş olduğu saptanmıştır (80, 81). KY'de SERCA ekspresyon seviyesinde değişik sonuçlar elde edilmesinin nedeni, insan çalışmaları için ilaç tedavisi, yaş ve cinsiyetin yanı sıra, hayvan modelleri için ise yöntemsel farklılıklar ve hastalığın şiddeti gibi birçok etken ile açıklanabilir. Yapılan deneysel çalışmalarda SERCA2a gen transferinin kas fonksiyonunu iyileştirdiği ve KY'den koruduğu gösterilmiştir. SERCA2a-aracılı Ca^{+2} taşınması KY patolojisinde önemli bir rol oynamaktadır (82, 83).

2.1.2.2.Fosfolamban

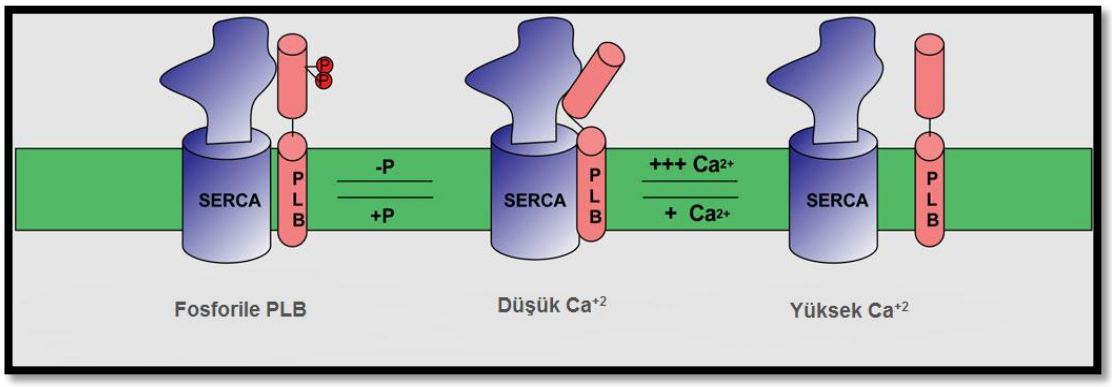
PLB, SERCA'nın önemli bir düzenleyicisidir. PLB, primer yapısı türler arasında yüksek oranda korunmuş olan 52 aa'dan oluşmuş bir fosfoproteindir. Yavaş kasılan iskelet kası ve düz kas dokuları ile karşılaştırıldığında, kalpte daha yüksek seviyelerde eksprese edilmektedir. PLB, kalpte β-adrenerjik yanıtların esas mediyatörüdür. Protein kinaz A (PKA) ve CaMKII tarafından PLB'nin sırasıyla Ser^{16} ve Thr^{17}'deki fosforilasyonunun SERCA aktivitesini arttırdığı belgelenmiştir (67, 84-91, Şekil 2.2). Defosforile PLB'nin, SERCA inhibitörü olarak görev aldığı ve PLB fosforilasyonunun bu inhibisyonu geri çevirerek Ca^{+2} taşınmasını 4 kat ve/veya daha fazla arttırdığı yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (67, 84-90). PLB tarafından SERCA pompasının düzenlenmesinin, SR içine artan Ca^{+2} taşınması için olduğu kadar, kalpte β-adrenerjik-aracılı yanıt için de birincil mekanizma olduğu kabul edilir.



Şekil 2.2. CaMKII ve PKA Tarafından PLB'nin Fosforilasyonu (92)

2.1.2.2.1.Fosfolamban Ekspresyon ve Fosforilasyonunun Düzenlenmesi

PLB, SERCA inhibitörüdür. Bu nedenle, PLB seviyesi ve PLB'nin fosforilasyon durumunda artma ya da azalma SR Ca^{+2} geri alınma fonksiyonunu ve kas kontraktilitesini doğrudan etkileyebilir (Şekil 2.3). PLB hem atriyumda hem de ventrikülde eksprese edilir, ancak ventrikül ile karşılaştırıldığında atriyumda daha düşük seviyelerdedir.



Şekil 2.3. SERCA ve PLB Etkileşimi (31)

PLB ekspresyonu ve fosforilasyon durumunun hastalık koşullarında değişmiş olduğu gösterilmiştir (93). Defosforile PLB'nin STZ ile oluşturulan DKMP'de artmış olduğu rapor edilmiştir. Defosforile PLB'deki artış ile birlikte SERCA pompasındaki azalmanın, DKMP'de SR'ye Ca^{+2} pompalanması ve kas gevşemesini önemli ölçüde etkileyebildiği öne sürülmüştür.

PLB'nin fosforilasyon durumu hem KY olan hayvan modellerinde, hem de insanlarda ileri dönem miyokardiyal yetmezlikte incelenmiştir (94-100). Sonuçlar modele bağlı olup bazı çalışmalar, KY'de artan PLB fosforilasyonunu (94,95), bazıları ise defosforilasyon durumunda bir azalma olduğunu göstermiştir (96, 97). İnsan KY örnekleri üzerinde yapılan çalışmalar, Ser^{16}'daki PLB fosforilasyonunda bir azalma olduğunu göstermiştir. Ancak Thr^{17}'deki fosforilasyon durumunda hiçbir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Bu bulgular, kalp yetmezliklerinde SERCA2a'nın Ca^{+2}'ye azalan duyarlılığı ile koreledir (97-101). Bu çalışmalardan, PLB fosforilasyon düzeyinin KY'nin şiddetine bağlı olabileceği ve bu modellerde β-adrenerjik sinyal yolaklarının durumundan etkilenebileceği sonucuna varılabilir.

2.1.2.2.2.Fosfolamban Aktivitesinin SERCA Pompası Üzerindeki Etkisi

Çift katmanlı lipid tabakasındaki PLB'nin saflaştırılması ve yeniden dizaynı PLB'nin bir kanal olarak davrandığını düşündürmektedir (67). Gen klonlama ve TG fare teknolojisinin ortaya çıkışı ile PLB'nin rolü TG ve geni baskılanmış fare modelleri kullanılarak kapsamlı olarak çalışılmaktadır (67, 84, 85-90). PLB geni baskılanmış fare modeli, PLB'nin kalpte β-adrenerjik yanıtın bir düzenleyicisi olduğuna yönelik ilk kanıtları sağlamıştır (102). PLB'nin farklı miktarda aşırı eksprese olduğu TG fare modelleri incelenmiştir (103-106). Bu çalışmalarda, PLB'nin, Ca^{+2} geri alınmasının maksimum hızını (V_{max}) etkilemeden SERCA'nın Ca^{+2} afinitesini etkileyerek, SERCA aktivitesini düzenlediği öne sürülmüştür. Bu veriler, PLB/SERCA oranının, SR'ye Ca^{+2} geri alınması ve kalp kontraktilitesi için önemli bir belirleyici olduğunu düşündürmektedir. Kalpteki PLB kaybı, hiçbir belirgin patoloji olmaksızın kasılma ve gevşeme hızını, SR'ye Ca^{+2} pompalanma hızını ve Ca^{+2} depolarını arttırırken, PLB/SERCA oranındaki artış ile SERCA pompasının maksimum inhibisyonu

kardiyak kontraktilitede azalma ve kardiyak hipertrofi gelişimi ile sonuçlanmıştır. Buna göre, farede PLB kaybı iyi tolere edilebilir ancak, insandaki benzer bir durum dilate kardiyomiyopati ve ölümle sonuçlanır (107, 108).

Yapılan bir çalışma SERCA pompasının yavaşça dönen oligomer agregatları ve son derece dinamik monomerler şeklinde SR membranında bulunduğunu düşündürmektedir (109). SERCA ile PLB etkileşimi SERCA pompalarının oligomerler şeklinde agregasyonunu sağlar. Oluşan bu oligomerlerin yavaş döndüğü düşünülmektedir. PLB fosforile olduğunda, SERCA pompasından ayrılır ve böylece büyük agregatlardaki azalma sonucunda SERCA2a'nın dönme hareketliliği artar (110). Bu modelde, PLB fosforilasyonu ile SERCA kinetik olarak elverişsiz durumundan daha aktif duruma geçer. Bu modele göre PLB fosforilasyonu, PLB pentamerleri içine PLB monomerlerinin agregasyonunu sağlar, bunun tersi de deagregasyona neden olur (109). PLB pentameri, defosforile olduğunda SERCA pompası ile güçlü bir çekim nedeniyle kolayca pentamerden ayrılan PLB monomerleri için bir depo görevi görmektedir. Ayrıca pentamerlerin SERCA'yı inhibe etme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (111). Bu nedenle, PLB'nin inhibitör fonksiyonunun pentamerik PLB'nin monomerik forma ayrışmasına bağlı olup olmadığı tam olarak açık değildir.

2.1.2.2.3.Kontraktiliteyi ve SR'ye Ca^{+2} Taşınmasını İyileştirmek İçin Gen Hedefleri

KY'de Ca^{+2} taşınmasının iyileştirilmesi için gen terapisine çok fazla ilgi gösterilmektedir (82, 112-115). KY'li insanlardan elde edilen veriler, SR'ye Ca^{+2} taşınmasındaki azalmanın, yetmezlik görülen kalplerde gözlenen negatif kuvvet frekansından sorumlu olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle, yeni çalışmalar SERCA2a'nın adenoviral aracılı gen transferi veya PLB inhibisyonu ile SERCA pompa aktivitesinin iyileştirilmesine odaklanmıştır. Adenoviral gen transferi çalışmalarında, insanda yetmezlik gözlenen ventrikül miyositlerinde SERCA2a'nın aşırı ekspresyonunun Ca^{+2} taşınmasını arttırdığı, kasılma ve gevşeme hızını iyileştirdiği gözlenmiştir (83). Hajjar ve ark. miyokardın içine genleri iletmek için

kateter bazlı bir teknik geliştirmişlerdir (83, 114, 115). Aşırı basınç yüklü hipertrofili bir sıçan modelinde (SERCA2a seviyelerinin azaldığı ve ciddi kontraktil disfonksiyonun bulunduğu) SERCA2a gen transferi ile hem sistolik hem de diyastolik disfonksiyonun düzeldiği gösterilmiştir. Ayrıca, SERCA2a gen transferi, I/R hasarlı bir sıçan modelinde ventriküler aritmileri ortadan kaldırmak için kullanılmıştır (116, 117). SERCA2a aşırı ekspresyonunun, I/R sırasındaki ventriküler aritmileri azalttığı ve ön duvarda duvar kalınlaşmasını iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmalar, diyastolik Ca^{+2}'de azalma ve intraselüler iyonların daha iyi kullanılmasının kardiyomiyositlerin iyileştirilmiş sağkalımlarıyla ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle, artan SERCA2a aktivitesi ile Ca^{+2} taşınmasının iyileştirilmesi, kardiyak inotropiyi devam ettirmek ve aşırı Ca^{+2} yükünün patolojik etkilerinden korumak için kritik bir öneme sahiptir.

PLB ablasyonunun, fare modellerinde yapısal ve fonksiyonel bozuklukları önlediği gösterilmiştir (84, 118). Del Monte ve ark. (119) tarafından insanda yetmezlik gözlenen kardiyomiyositlerdeki duyarsız (antisens) PLB adenoviral gen transferinin kontraktiliteyi, Ca^{+2} taşınmasını ve kuvvet frekans yanıtını onardığı gösterilmiştir. Mutant PLB ekspresyonu, miyokardiyal SR'ye Ca^{+2} geri alınmasını arttırarak kontraktilite ve LV sistol fonksiyonunun ilerleyen bozukluğunu baskılamıştır (120). Fakat, PLB fonksiyon kaybı insanlarda genç yaşta dilate kardiyomiyopatiye neden olduğundan, PLB aktivitesinin kronik inhibisyonu insan kalbi için yararlı olmayabilir (107, 108).

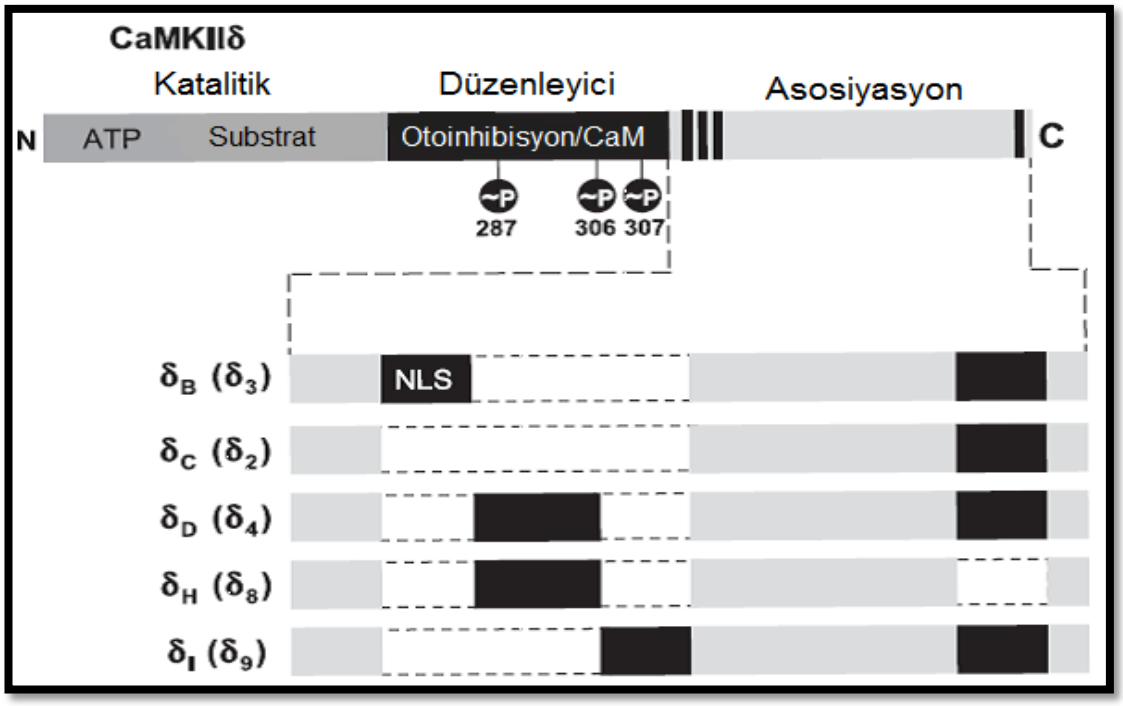
Bu çalışmalar kalbin çeşitli fizyolojik ihtiyaçlarını karşılamak için PLB/SERCA fizyolojik oranını korumanın önemli olduğunu düşündürmektedir.

2.1.2.3.CaMKII

CaMKII, ECC ve Ca^{+2} dengesinde görev alan önemli proteinlerinden biridir.

2.1.2.3.1.CaMKII İzoformları

CaMKII'nin farklı genler tarafından kodlandığı bilinen 4 izoformu bulunmaktadır (α, β, γ, δ). α ve β ağırlıklı olarak nöronal dokuda eksprese edilmektedir (121). δ izoformu ise kalpte eksprese edilen esas izoformdur (122). Her CaMKII izoformunun birkaç alternatif alttipi bulunur. Özellikle δ izoformu 8 alttipe sahiptir. δ_B (δ_3), aşırı değişken bölgede bulunan 11 aa'lık nükleer lokalizasyon sinyali (NLS, Şekil 2.4) sayesinde çekirdekte baskın bulunurken, δ_C (δ_2) sitoplazmada baskındır. (123, 124). CaMKIIδ_B izoformu bir NLS içerir ve hipertrofik gen ekspresyonunda anahtar rol oynar. Sitoplazmik δ_C izoformu Ca^{+2} düzenleyici proteinlerin fosforillenmesi yoluyla ECC'ye etki edebilir ve apopitoza götüren sinyal iletiminde etkili olabilir (124). δ_8 ve δ_9 alttipleri erişkin kalp dokusunda bulunmaktadır (125, 126). δ_4 ise embriyonel kalp dokusunda bulunur (126). TG farelerde δ_B aşırı ekspresyonu kalpte hipertrofiye neden olur (127).

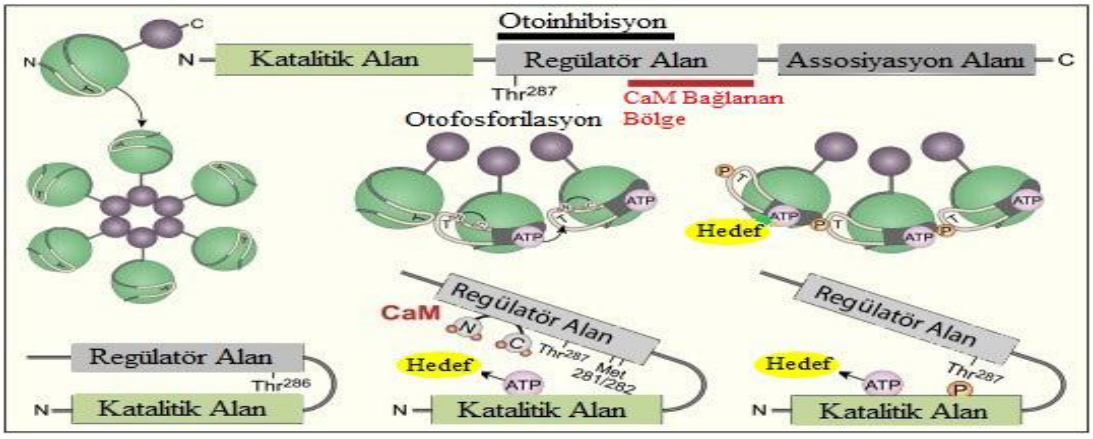


Şekil 2.4. CaMKIIδ İzoformları (124)

2.1.2.3.2.CaMKII‘nin Monomerik Yapısı

CaMKII monomeri, amino (NH_2) terminalinde bir katalitik alan, merkezinde bir düzenleyici alan ve karboksil (COOH) terminalinde bir ilişki (assosiyasyon) alanından oluşmaktadır.

Katalitik alan, CaMKII yapısı içindeki serin ya da treoninlere ATP'den fosfat transferini katalize etmektedir (128). Düzenleyici alan, bazal koşullar altında, katalitik alana bağlanan ve onu sınırlandıran bir psödosubstrat dizisi içerir. Ayrıca kalmodulin (CaM) bağlayıcı alan da düzenleyici alanda bulunmaktadır. Psödosubstrat dizisi, $Thr^{286/287}$ (otofosforile olan alan, 129) ve $Met^{281/282}$,nin (130) bulunduğu bölgeyi kapsamaktadır. Thr^{286} fosforilasyonu veya Met^{281} ve Met^{282} oksidasyonu CaMKII'yi bir Ca^{+2}-CaM bağımsız sinyale dönüştürerek CaM'nin ayrılmasından sonra katalitik ve düzenleyici alanların yeniden birleşmesini engellemektedir (Şekil 2.5). Bir inhibitör otofosforilasyon bölgesi olan $Thr^{306/307}$, Ca^{+2}-CaM bağlanma dizisi ile örtüşmektedir. Thr^{306}'daki fosforilasyon, CaMKII aktivitesi için negatif bir düzenleyici mekanizma sağlar. Bazal koşullarda, Thr^{306}'da fosforilasyon Ca^{+2}-CaM bağlanmasını önleyerek CaMKII aktivitesini azaltır (131). Met^{308} oksidasyonu, düzenleyici alanın COOH terminal bölgesinin CaM bağlama isteğini azaltır (130).



Şekil 2.5. CaMKII’nin Fosforilasyonu ve Oksidasyonu (132)

2.1.2.3.3.Otofosforilasyonun Önemi

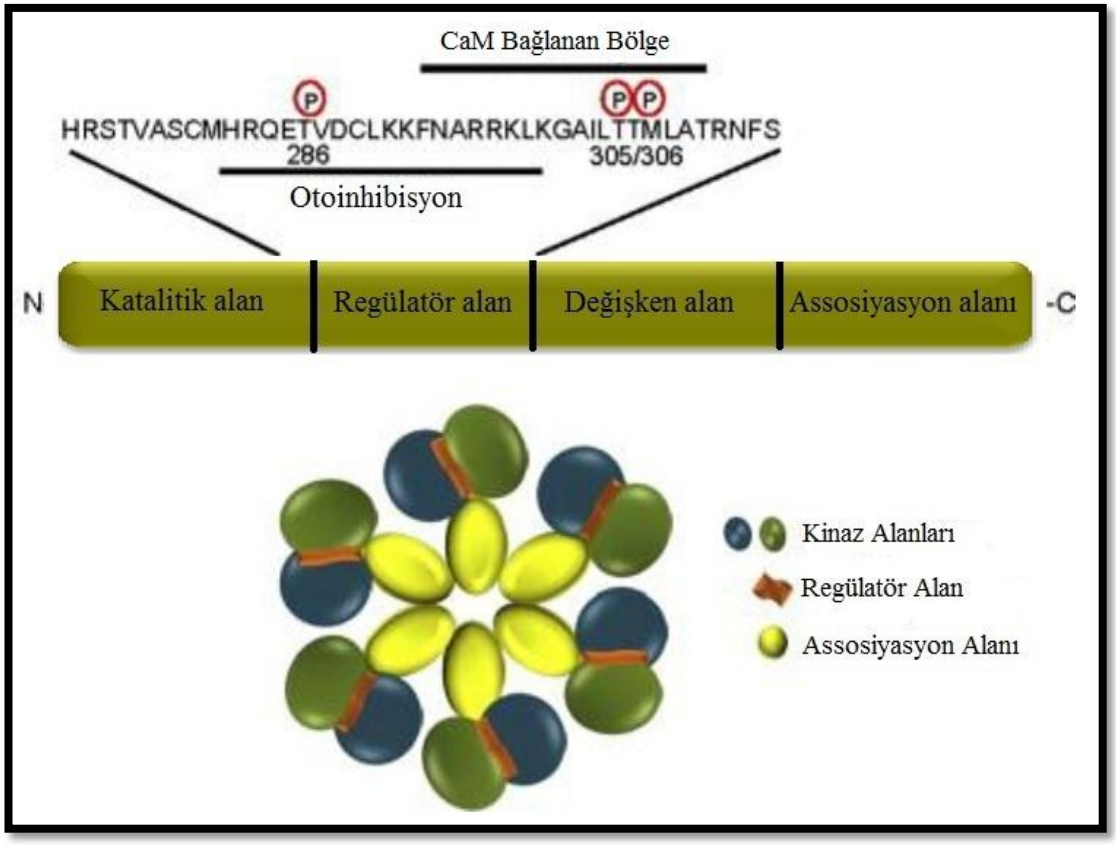
Bir intraholoenzim reaksiyon tarafından meydana gelen otofosforilasyonun CaMKII aktivitesi için iki önemli etkisi vardır (133).

1) $Thr^{286/287}$ otofosforilasyonu, "CaM yakalama" olarak da bilinen CaM-CaMKII bağlanma afinitesinde 1.000 katlık artışa neden olur (134).

2) Otofosforilasyon, CaM yokluğunda dahi kinazın katalitik etkinliğini devam ettirme yeteneğini sağlar (129).

2.1.2.3.4.CaMKII'nin Holoenzim Yapısı

Yaklaşık 600 kilodalton (kDa) ağırlığında olan holoenzim yapısı, birden çok assosiyasyon alanlarının etkileşimi ile oluşan yaklaşık 145 angstrom (A°) çapında birbirinin üstüne yığılmış iki merkezi halkadan oluşur. Bu merkezi halka (assosiyasyon alanından oluşur) düzenleyici ve katalitik alanlardan oluşan bir dış halkaya iskele görevi görür (135, Şekil 2.6). Bu düzenleme, holoenzim içindeki bitişik CaMKII monomerlerinin hedef proteinler ile etkileşime girebilen katalitik alanlarının yüksek konsantrasyonunu sağlar. CaMKII otofosforilasyonu ($Thr^{286/287}$) kritik olarak holoenzim içindeki monomerlerin düzenlenmesine bağlıdır.



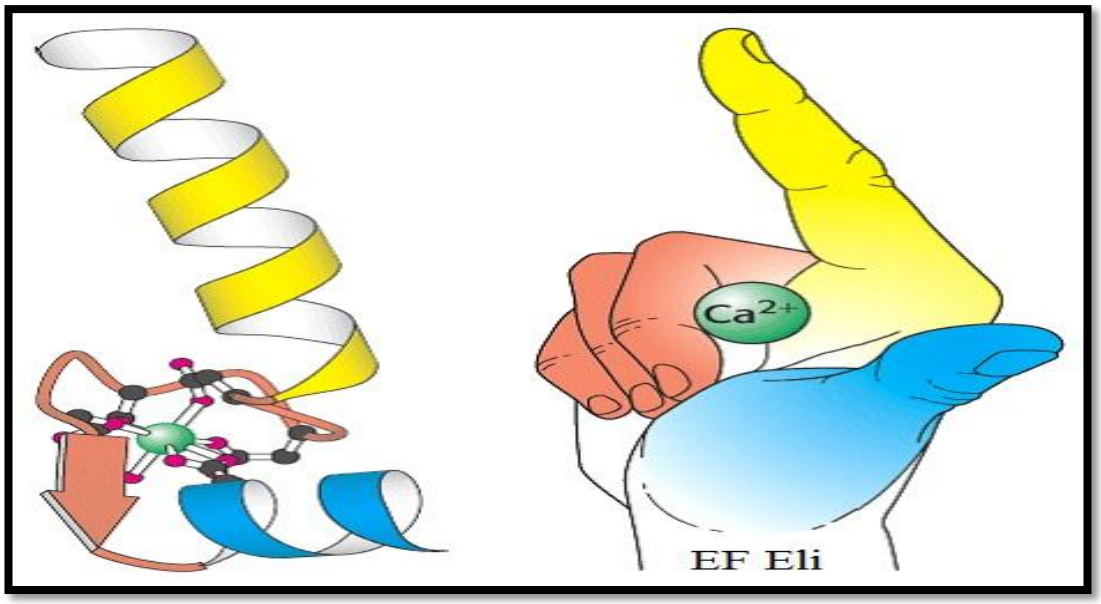
Şekil 2.6. CaMKII'nin Holoenzim Yapısı (136)

2.1.2.3.5.CaMKII'nin Hücresel Yerleşimi

CaMKII, sadece Ca^{+2} düzeyini tespit etmeye değil aynı zamanda Ca^{+2} homeostazisi ile ilişkili anahtar regülatör proteinlerin aktivitelerini düzenlemeye de hizmet eder. Ca^{+2} sinyalizasyonu bütünlüğünün bozulmaması için bu yolağı düzenleyen kinaz ve fosfatazların kontrol edilmesi şarttır (137). Protein kinaz A ve C (PKC) gibi kinazlar Ca^{+2} dengesinde görevlidir (138-140). CaMKII, ventrikül miyositlerinin Z bandı bölgesinde yoğun olmak üzere LTCC'ler ve RyR çevresinde kümelenmiştir (141, 142).

2.1.2.3.6.CaMKII Aktivasyonu: Moleküler Mekanizmalar

CaMKII, aktivasyon için Ca^{+2}-CaM'ye ihtiyaç duyar. CaM, 4 Ca^{+2} bağlayıcı EF kolu olan (2 EF kol/lob, Şekil 2.7) iki loblu hücre içi proteinidir. CaM'nin NH_2 ve COOH lobları işlevsel olarak eşdeğer değildir (143). CaM bağlanması tercihen COOH terminal lobu tarafından CaMKII'yi aktive eder (144).



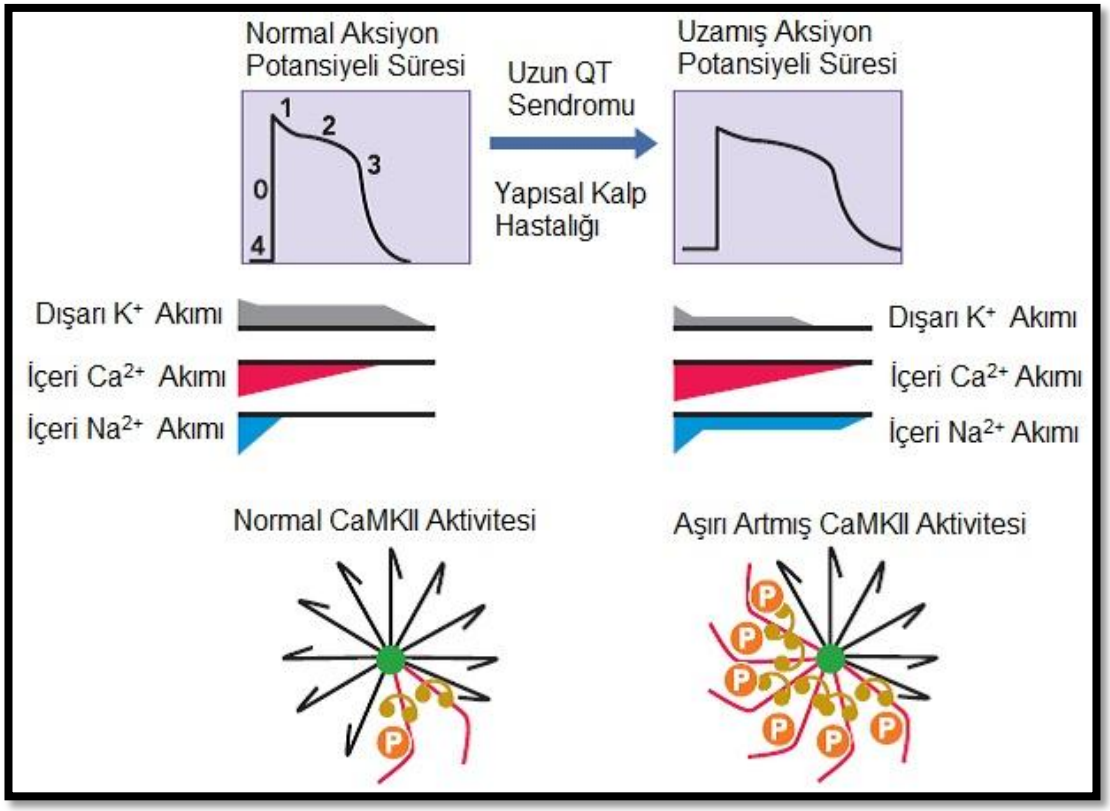
Şekil 2.7. Kalmodülinin Yapısı (145)

Düşük Ca^{+2}-CaM konsantrasyonlu koşullar altında, katalitik alana düzenleyici alanın bağlanması nedeniyle çoğu CaMKII inaktiftir (146). Katalitik ve düzenleyici alanlar arasındaki inhibitör etkileşim, substrat ve ATP bağlanmasını önler (147-149). Ca^{+2}, katalitik alanı kendi psödosubstratından kurtaracak bir konformasyon değişikliğini tetikleyerek düzenleyici alana bağlanır.

2.1.2.3.7.CaMKII Aktivasyonu: Hücresel Mekanizmalar

Kalp aksiyon potansiyeli, CaMKII aktivasyonunun başlatılmasında önemli role sahiptir (Şekil 2.8). Uzamış kardiyak aksiyon potansiyeli süresinin (APS) nedeni, plato fazıdır. Bu faz, LTCC'den Ca^{+2} içeri akımı ile repolarize edici dışa akımlar arasındaki dengeden meydana gelmektedir. Kardiyak aksiyon potansiyelinin bu uzamış plato fazı, LTCC'den Ca^{+2} akımı (I_{Ca}) yoluyla Ca^{+2} girişine izin vererek ve uzamış elektriksel refrakter dönem oluşturarak hücre membranı uyarılabilirliğini sınırlamada kritik bir rol üstlenir. APS'nin uzaması ile hücre içine Ca^{+2} geçişi uzadığı için CaMKII aktivasyonu artmıştır (150). Kardiyomiyositlerde, CaMKII aktivitesi APS'nin uzamasıyla (151) ve artmış kalp hızları (152) ile artış göstermektedir. K^+ kanal blokeri olan klofiliuma maruz bırakılmış Langendorf ile perfüze edilmiş kalplerde APS uzamıştır ve frekansı aynı olan kontrol kalpler ile karşılaştırıldığında, Ca^{+2}-CaM bağımsız aktivitesi artmıştır (151). Langendorf ile perfüze kalplerde atım frekansının arttırılmasının Thr^{287} otofosforilasyonu ve CaMKII aktivitesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (152). Genetik (uzun QT sendromu) ve yapısal kalp hastalıklarında (KY) APS uzamıştır (Şekil 2.8). Buna aşırı artmış CaMKII aktivasyonunun neden olduğu düşünülmektedir (142, 151).

CaMKII aktivasyonu, intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişikliklere bağlı olduğundan APS'deki değişiklikler CaMKII aktivasyon derecesini etkiler. Normal aksiyon potansiyeli, baskın olarak içeri Na^+ akımından (Faz 0, I_{Na}) oluşan bir depolarizasyon fazı ile başlar. Faz 2 ve Faz 3 içeri Ca^{+2} akımı ve dışarı K^+ akımından oluşur. Faz 2 ve Faz 3'de ECC'nin normal seyri için gerekli Ca^{+2} içeri alınır. Uzun QT sendromu ve yapısal kalp hastalıkları APS'nin uzamasıyla ilişkilidir ve bu da azalmış K^+ akımı, artmış Ca^{+2} ve Na^+ akımını içeren elektriksel bir yeniden modellenmeye bağlıdır. Bu uzama, kardiyomiyosit içine aşırı Ca^{+2} girişine neden olur ve CaMKII'nin hiperfosforilasyonuyla sonuçlanır (153).



Şekil 2.8. Aksiyon Potansiyeli ve CaMKII Aktivitesi (153)

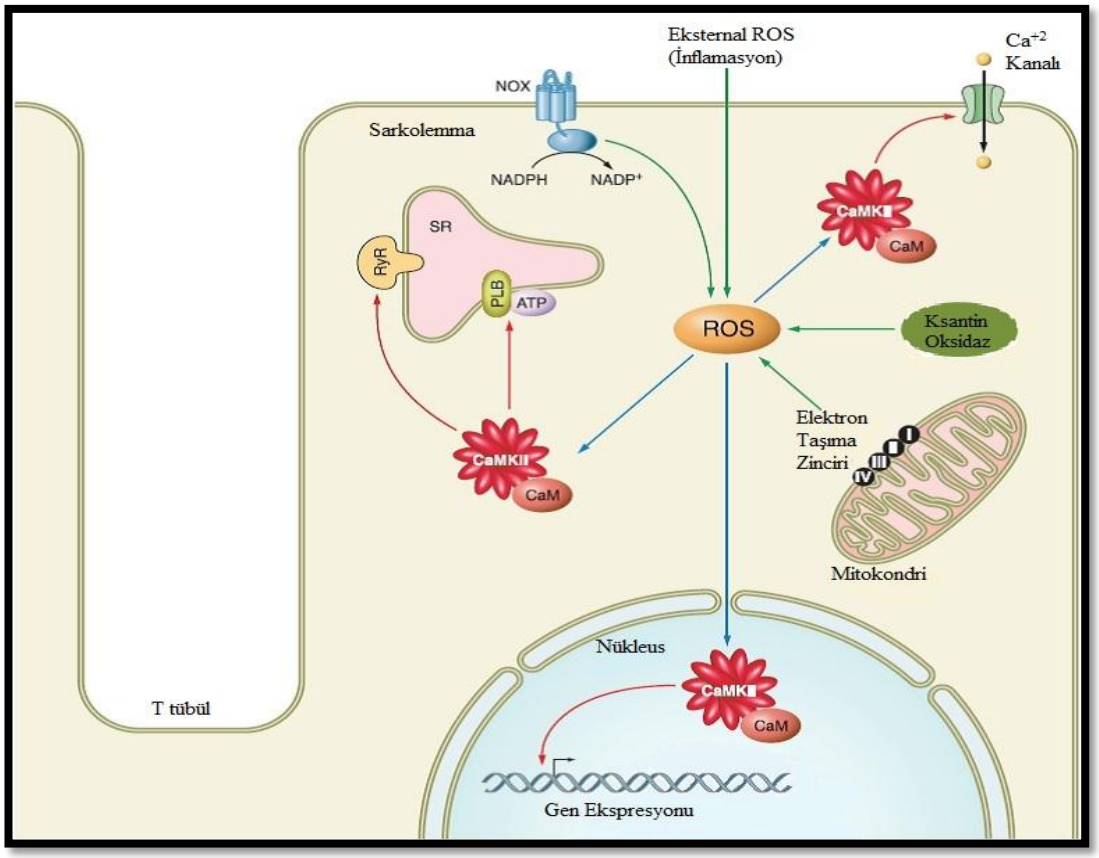
CaMKII, LTCC'leri indükleyerek kapıların hızlı ve uzun süreli açık kalmasına neden olur (154). CaMKII, dinamik olarak artan I_{Ca}'dan sorumludur (155-157). CaMKII, kardiyak I_{Na}'nın inaktif olmayan bileşenindeki (noninactivating component) fosforilasyon bağımlı artışı ile APS'yi arttırabilir (158) . Hem I_{Ca} hem de I_{Na}, plato fazı sırasında APS uzamasına yol açan net içe akımı arttırır. CaMKII'nin aşırı ekspresyonu, muhtemelen repolarize edici K^+ akımlarının ekspresyonunun azalmasına bağlı, uzamış APS ile seyreden kardiyomiyopati ve KY'ye yol açar (159). CaMKIV'ün aşırı eksprese olduğu farelerde CaMKII ekspresyonu ve aktivitesinde koordineli bir şekilde artış görülmüştür ve azalmış repolarize edici K^+ akımlarına bağlı APS'nin uzaması gösterilmiştir (160).

APS'nin aşırı uzaması ve artmış CaMKII aktivitesi, yüksek LTCC aktivitesi ile I_{Ca}'yı arttırarak erken artdepolarizasyonlara (EAD) yatkınlık oluşturur (142, 160, 161). APS'nin uzaması CaMKII aktivasyonuna, artmış SR Ca^{+2} dolumuna ve gecikmiş artdepolarizasyon (DAD) başlatan geçici içe doğru akımın aktivasyonuna yol

açar (150). EAD'ler ve DAD'ler KY'deki atriyal fibrilasyon ve ventriküler aritmiler dahil birçok aritminin olası başlatıcı nedeni olan hücre membranı potansiyelindeki depolarize edici osilasyonlardır (162).

2.1.2.3.8.Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Aracılı CaMKII Aktivitesi

Son zamanlarda, ROS aracılı CaMKII aktivasyonunun yeni bir formu tarif edilmiştir. Jurkat hücrelerinin hidrojen peroksite (H_2O_2) maruz bırakılması ile ROS aracılı mekanizma tarafından CaMKII aktivasyonunda artış gözlenmiştir (163). H_2O_2'ye maruz bırakılmış yetişkin ventrikül miyositlerinde, oksidan stres koşulları altında PLB'nin CaMKII aracılı fosforilasyonunun arttığı gösterilmiştir (164, Şekil 2.9).

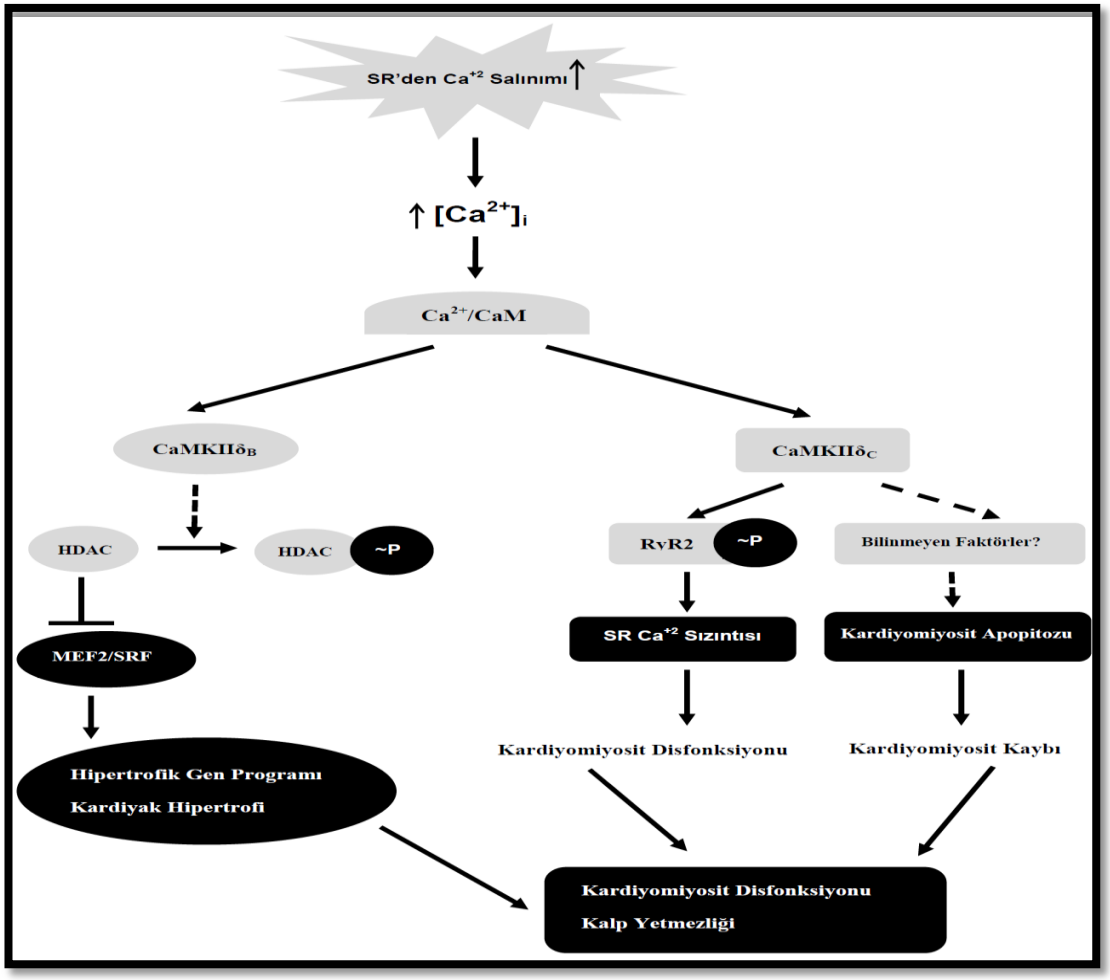


Şekil 2.9. ROS ve CaMKII İlişkisi (165)

2.1.2.3.9.Hastalık Durumlarında CaMKII

TG farelerde CaMKIIδ_C aşırı ekspresyonu RyR'nin fosforillenmesini arttırır, kalp kasını dilate eder ve KY'ye neden olur (166, Şekil 2.10). CaMKIIδ_C aşırı ekspresyonu APS'nin uzamasına, membran potansiyelinde artdepolarizasyon denilen proaritmik salınmalara, aritmiye ve ani ölüme neden olmaktadır (159, 167). Yetişkin tavşan ventrikül miyositlerinde yapısal olarak aktif mutant CaMKIIδ_C (T287D) ekspresyonunun APS'yi uzattığı ve aritmiyi indüklendiği rapor edilmiştir (168).

CaMKIIδ aktivasyonun artması mitokondriyal Ca^{+2} artışı ve sitokrom c salgılanması ile apopitoza neden olur. Anjiyotensin II'nin (ATII) oksidasyon aracılı CaMKII aktivasyonu ile kaspaz 3 aktivitesindeki artış kardiyak apopitoza neden olmaktadır (130). CaMKIIδ_B'nin arttırıldığı TG sıçanlarda spontan kardiyak hipertrofi gözlenirken (127), CaMKIIδ_C'nin arttırıldığı TG sıçanlarda hipertrofik ve dilate kardiyomiyopatiye bağlı KY gözlenmiştir (166).



Şekil 2.10. Aşırı CaMKII Artışı Sonucu KY Gelişmesi (124)

2.1.2.3.10.Terapötik Hedef Olarak CaMKII İnhibisyonu

Hipertrofi ve KY'de CaMKII aktivitesi artmıştır (125, 166). TG farelerde CaMKII'nin aşırı ekspresyonu; bozulmuş Ca^{+2} taşınması, APS uzaması, KY ve aritmi ile sonuçlanırken (159, 160, 166), CaMKII inhibisyonu KY ve aritmi gelişimine karşı kalbi korumaktadır (160, 169).

2.1.2.4.L Tipi Ca^{+2} Kanalı

LTTC'ler, Ca^{+2}'nin kardiyomiyositlere girişindeki esas kanalları oluşturmaktadır. Baskın olan LTTC subuniti ($Ca_V1.2$), voltaj kapılı, membrana bağlı 6 altüniteden oluşmaktadır. Hücre zarının depolarizasyonu ile kanal aktive olur. I_{Ca} seviyelerini CaM ve CaMKII sinyalleri düzenlemektedir. Ca^{+2} ve CaM direkt olarak sinyal iletimini hızlandırır. Ca^{+2}/CaM CaMKII'yi aktive eder, I_{Ca} artar ve bu süreç I_{Ca} kolaylaştırma olarak adlandırılır (170).

2.1.2.5.Riyanodin Reseptörü

LTCC aracılığıyla Ca^{+2} girişi, ''Ca^{+2} ile indüklenen Ca^{+2} salgılanması'' olarak adlandırılan SR'deki RyR'den Ca^{+2} salgılanmasını tetikler. CaMKII, LTCC ve RyR'yi fosforilleyerek Ca^{+2} ile indüklenen Ca^{+2} salgılanmasını sağlar. KY olan insan ve hayvan çalışmalarında, RyR_2'nin hiperfosforile olması (171, 172), uygunsuz diyastolik SR Ca^{+2} salgılanmasına (Ca^{+2} ateşlemesi) neden olarak:

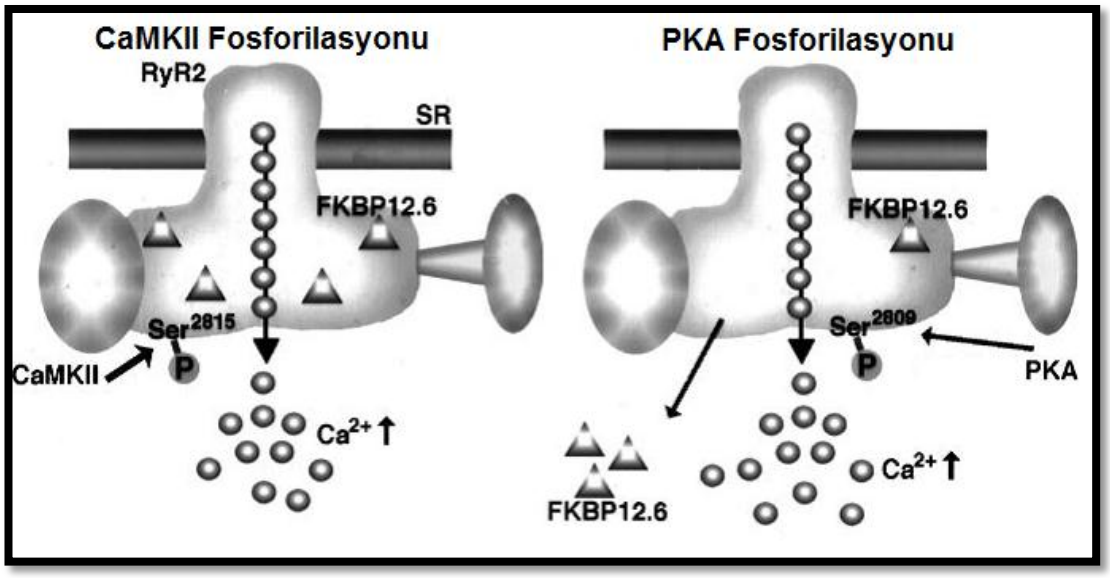
1. Bozulmuş kontraktiliteye katkıda bulunur.

2. DAD'leri arttırır.

3. Kardiyomiyopatik gen programlarını aktive eder.

RyR, dört özdeş alt birimden oluşan 2,5 megadalton (MDa) ağırlığında intraselüler Ca^{+2} salgılanma kanalıdır. PKA ve CaMKII (152, 173, 174) Ser^{2809} ve Ser^{2815} bölgelerinden RyR'ye direkt olarak bağlanarak RyR'yi fosforile eder (Şekil 2.11). RyR'nin CaMKII tarafından artan fosforilasyonu (Ser^{2815}) ve artan CaMKII otofosforilasyonu ile ilişkili yüksek kalp hızlarında RyR kanal aktivitesi artışı gösterilmiştir (152). CaMKII'nin aşırı eksprese olduğu TG farelerde, RyR'ler tarafından Ca^{+2} ateşleme frekansı artışı gösterilmiştir (159). LV'de basınç artışı ve aşırı hacim yüklenmesi ile KY modellenen tavşanlardaki bir çalışmada, RyR'lerin

CaMKII tarafından fosforilasyonunda artış gözlenmiştir. Bu modelde inhibe edilen CaMKII, SR'den Ca^{+2} sızıntısını azaltmış ve SR Ca^{+2} içeriğini arttırmıştır (171). Kültürdeki yetişkin ventriküler miyositlerde adenovirüs aracılı CaMKII'nin aşırı ekspresyonu RyR fonksiyonunu ya tetikler (175) ya da inhibe eder (176). Bu veriler RyR fonksiyonunda CaMKII'nin önemli düzenleyici rolünü desteklerken, CaMKII'nin RyR üzerindeki etkisinin nasıl olduğu ve CaMKII'nin çeşitli modellerde neden hem inhibitör hem de uyarıcı olduğu tartışmalıdır.



Şekil 2.11. PKA ve CaMKII Tarafından Ser^{2809} ve Ser^{2815} Bölgelerinden RyR'nin Fosforile Edilmesi (152)

2.1.2.6.Na^{+}/Ca^{+2} Değiş Tokuşturucusu (NCX)

NCX1 miyokarddaki dominant izoformdur ve sarkolemmal membranda bir Ca^{+2} için üç Na^{+}'nın değiş tokuşuna aracılık etmektedir. Bu işlem çift yönlüdür ve hücrelere hem Ca^{+2} girişine hem de hücrelerden Ca^{+2} çıkışına neden olmaktadır (177). Bu kanaldan hücre dışına Ca^{+2} çıkışı, ECC için Ca^{+2} homeostazisinde önemli rol oynar (36). Bu kanaldan Ca^{+2} girişi ise kardiyak kontraksiyonun erken fazında SR'den Ca^{+2}

aracılı Ca^{+2} salgılanmasına yol açan fizyolojik bir mekanizma olabilir (178). Bu kanaldan artmış Ca^{+2} girişi anormal Ca^{+2} homeostazisine ve elektriksel aktiviteye neden olur ki bu da kalp yaralanmalarında önemli bir nedendir (179).

2.2.Diabetes Mellitus

DM, hiperglisemi ile karakterize insülin sekresyonu, insülin etkisi veya her ikisinde de bozukluk olan metabolik hastalıklar grubudur (180).

Gestasyonel DM ve diğer spesifik DM tipleri olmasına rağmen esas olarak tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki tip DM görülmektedir (181).

2.2.1.Tip 1 ve Tip 2 Diabetes Mellitus

2.2.1.1.Tip 1 Diabetes Mellitus

2.2.1.1.1.Tip 1 Diabetes Mellitus Fizyopatolojisi, Etiyolojisi ve Genel Özellikleri

Mutlak insülin eksikliği vardır. Hastaların % 90'ında otoimmün (Tip1A), % 10 kadarında nonotoimmün (Tip1B) β hücre yıkımı söz konusudur.

Genellikle 30 yaşından önce başlar. Okul öncesi (6 yaş civarı), puberte (13 yaş civarı) ve geç adölesan dönemde (20 yaş civarı) üç pik görülür. Hiperglisemiye ilişkin (ağız kuruluğu, polidipsi, açlık hissi, poliüri, kilo kaybı ve yorgunluk gibi) semptom ve bulgular aniden ortaya çıkar. Hastalar sıklıkla zayıf ya da normal kilodadır. Diyabetik ketoasidoza (DKA) yatkınlık vardır.

2.2.1.1.2.Tip 1A Diabetes Mellitus

Genetik yatkınlığı bulunan kişilerde çevresel tetikleyici faktörlerin (virüsler, toksinler, emosyonel stres) etkisiyle otoimmünite tetiklenir ve ilerleyici β hücre hasarı başlar. β hücre rezervi % 80-90 oranında azaldığı zaman klinik diyabet semptomları ortaya çıkar. Tip 1A diyabette başlangıçta kanda adacık otoantikorları pozitif bulunur.

2.2.1.1.3.Tip 1B Diabetes Mellitus

Otoimmünite dışındaki bazı nedenlere bağlı mutlak insülin eksikliği sonucu gelişir. Kanda adacık otoantikorları bulunmaz.

2.2.1.2.Tip 2 Diabetes Mellitus

2.2.1.2.1.Tip 2 Diabetes Mellitus Fizyopatolojisi, Etiyolojisi ve Genel Özellikleri

2.2.1.2.1.1.İnsülin Direnci

Hücre reseptör defektine bağlı olarak üretilen insülinin kullanımında ortaya çıkan sorunlar nedeniyle glukoz hücre içine absorbe edilip enerji olarak kullanılamaz (hücre içi hipoglisemi vardır). Periferik dokularda (özellikle kas ve yağ dokusunda) insülinin etkisi yetersizdir. Kas ve yağ hücresinde glukoz tutulumu azalmıştır.

2.2.1.2.1.2.İnsülin Sekresyonunda Azalma

Pankreas, kan glukoz düzeyine yanıt olarak yeteri kadar insülin salgılayamaz. Karaciğerde glukoz yapımı aşırı derecede artmıştır. Hepatik glukoz yapımı artışından insülin sekresyon defekti ve sabaha karşı daha aktif olan insüliner sistem karşıtı hormonlar (kortizol, büyüme hormonu ve adrenalin; Dawn Fenomeni) sorumludur. Genellikle insülin direnci tip 2 diyabetin öncesinden başlayarak uzun yıllar tabloya

hakim olmakta, insülin sekresyonunda ciddi azalma ise diyabetin ileri dönemlerinde veya araya giren hastalıklar sırasında ön plana geçmektedir.

Çoğunlukla 30 yaş sonrası ortaya çıkar, ancak obez kişi sayısının artışı sonucu özellikle son 10-15 yılda çocukluk veya adolesan çağlarında ortaya çıkan tip 2 diyabet vakaları artmaya başlamıştır. Güçlü bir genetik yatkınlık söz konusudur. Ailede genetik yatkınlık arttıkça, sonraki nesillerde diyabet riski artar ve hastalık daha erken yaşlarda görülmeye başlar. Hastalar sıklıkla obez veya kiloludur [Beden kitle indeksi (BKİ)>25 kg/m^2]. Başlangıçta DKA'ya yatkınlık yoktur. Ancak uzun süreli hiperglisemik seyirde veya β hücre rezervinin azaldığı ileri dönemlerde DKA görülebilir. Hastalık genellikle sinsi başlangıçlıdır. Pek çok hastada başlangıçta hiçbir semptom yoktur. Bazı hastalar ise bulanık görme, el ve ayaklarda uyuşma ve karıncalanma, ayak ağrıları, tekrarlayan mantar enfeksiyonları veya yara iyileşmesinde gecikme nedeniyle başvurabilir (181).

Amerikan Diyabet Derneği (ADA) kriterlerine göre DM etiyolojik sınıflaması Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Diabetes Mellitusun Etiyolojik Sınıflandırılması (180)

<table>
<tr><td colspan="2">I. Tip 1 Diyabet (Sıklıkla insülin noksanlığına sebep olan β hücre yıkımı vardır.)
A. İmmün Aracılıklı
B. İdiyopatik</td></tr>
<tr><td colspan="2">II. Tip 2 Diyabet (Rölatif olarak; insülin yetmezliğinin görüldüğü, insülin direncinin olduğu durumlar ile insülin direncinden bağımsız, insülin sekresyonunun bozulduğu durum.)</td></tr>
<tr><td colspan="2">III. Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM)
Gebelik sırasında ortaya çıkan ve genellikle doğumla birlikte düzelen diyabet.</td></tr>
<tr><td>IV. Diğer Spesifik Diyabet Tipleri
A. β-Hücre Fonksiyonlarının Genetik Defekti
• 12. Kromozom, HNF-1α (MODY3)
• 7. Kromozom, Glukokinaz (MODY2)
• 20. Kromozom, HNF-4α (MODY1)
• 13. Kromozom, İnsülin Promoter Faktör-1 (IPF-1; MODY4)
• 17. Kromozom, HNF-1β (MODY5)
• 2. Kromozom, NeuroD1 (MODY6)
• Mitokondriyal DNA
• Diğerleri
B. İnsülinin Etkisindeki Genetik Defektler
• Tip A İnsülin Direnci
• Leprechaunism
• Rabson-Mendenhall Sendromu
• Lipoatrofik Diyabet
• Diğerleri
C. Pankreasın Ekzokrin Doku Hastalıkları
• Pankreatit
• Travma/Pankreatektomi
• Neoplazi
• Kistik Fibroz
• Hemokromatoz
• Fibrokalkulöz Pankreatopati
• Diğerleri
D. Endokrinopatiler
• Akromegali
• Cushing Sendromu
• Glukagonoma
• Feokromositoma
• Hipertiroidi
• Somatostatinoma
• Aldosteronoma
• Diğerleri</td><td>E. İlaç veya Kimyasal Ajanlar
• Vacor
• Pentamidin
• Nikotinik Asit
• Glukokortikoidler
• Tiroid Hormonu
• Diazoksid
• β–Adrenerjik Agonistler
• Tiyazid Grubu Diüretikler
• Dilantin
• Gama-İnterferon
• Diğerleri (Post Transplant Diyabet)
F. Enfeksiyonlar
• Konjenital Kızamıkçık
• Sitomegalovirüs
• Diğerleri
G. İmmun Aracılıklı Nadir Diyabet Formları
• Stiff-man Sendromu
• Anti-insülin Reseptör Antikorları
• Diğerleri
H. Diyabetle İlişkili Genetik Sendromlar (Monogenik Diyabet Formları)
• Down Sendromu
• Klinefelter Sendromu
• Turner Sendromu
• Wolfram (DIDMOAD) Sendromu
• Friedreich Tipi Ataksi
• Huntington Koresi
• Laurence-Moon-Biedl Sendromu
• Miyotonik distrofi
• Porfiria
• Prader Willi Sendromu
• Diğerleri</td></tr>
</table>

HNF-1α: Hepatosit Nükleer Faktör-1α; MODY1-10: Gençlerde görülen erişkin tipi diyabet formları (Maturity Onset Diabetes of The Young 1-10); HNF-4α: Hepatosit Nükleer Faktör 4α; IPF-1: İnsülin Promotör Faktör-1; HNF-1β: Hepatosit Nükleer Faktör1β; NeuroD1: Nörojenik Diferansiyasyon1; DNA: Deoksiribonükleik Asit; HIV: İnsan İmmun Yetmezlik Virüsü; DIDMOAD Sendr.: Diabetes İnsipidus, Diabetes Mellitus, Optik Atrofi ve Sağırlık (Deafness) ile Seyreden Sendrom (Wolfram Sendromu); KLF11: Kruppel Like Factor 11; CEL: Carboxyl Ester Lipase (bile salt DependenLipase); PAX4: Paired Box4; ABCC8: ATP Binding Cassette C8; KCNJ11: Potassium İnwardly-Rectifying Channel J11.

2.2.2. Diabetes Mellitus Önemi, Prevalansı ve Mortalitesi

DM önemli bir toplum sağlığı problemidir. Kardiyovasküler komplikasyonlar DM'li hastalarda morbidite ve mortalitenin temel nedenidir (182). İyi kontrollü tip 2 diyabetik kişilerde diyastolik disfonksiyon prevalansı % 30 kadardır. Doppler teknikleri kullanılarak, KAH olmayan tip 1 ve tip 2 diyabetik bireylerde benzer bir çalışmada, daha yüksek diyastolik disfonksiyon prevalansı (% 40-60) gösterilmiştir (183-186). Framingham ve ark.'nın yaptığı çalışmada diyabetiklerde KY insidansının erkeklerde iki, kadınlarda beş kat arttığı gösterilmiştir (6). DM prevalansı hızla büyümekte olup küresel prevalansının 2000 yılından 2030'a kadar 171 milyondan 366 milyona ulaşması beklenmektedir (2, Tablo 2.3).

Tablo 2.3. 2000 Yılındaki DM Vakalarının ve 2030'da Tahmin Edilen DM Vakalarının Ülkelere Göre En Yüksek Sayısal Değerleri (2)

Sıralama	2000		2030	
	Ülke	Şeker Hastalığı Olan Kişiler (Milyon)	Ülke	Şeker Hastalığı Olan Kişiler (Milyon)
1	Hindistan	31,7	Hindistan	79,4
2	Çin	20,8	Çin	42,3
3	ABD	17,7	ABD	30,3
4	Endonezya	8,4	Endonezya	21,3
5	Japonya	6,8	Pakistan	13,9
6	Pakistan	5,2	Brezilya	11,3
7	Rusya Federasyonu	4,6	Bangladeş	11,1
8	Brezilya	4,6	Japonya	8,9
9	İtalya	4,3	Filipinler	7,8
10	Bangladeş	3,2	Mısır	6,7

2.2.3.Diabetes Mellitus Tanısı

Aşağıda belirtilen ADA kriterlerinden bir tanesinin varlığı DM tanısı için yeterlidir (187).

Bu kriterler:

1. Açlık plazma glukoz düzeyinin 126 mg/dl ve/veya üzerinde saptanması,
2. İkinci saat tokluk plazma glukozunun 200 mg/dl ve/veya üzeri değerlerde saptanması,
3. DM semptomları ile birlikte olan ve rastgele alınan kanda plazma glukoz değerlerinin 200 mg/dl ve/veya üzeri değerlerde saptanması.

Bunlara ek olarak ADA 2006 ve 2011 önerilerine göre açlık plazma glukoz değerleri 100–125 mg/dl ve ikinci saat tokluk plazma glukoz düzeyleri 140–199 mg/dl olan değerler, bozulmuş glukoz toleransı olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca açlık plazma glukoz değerleri 100–125 mg/dl saptanan hastalara, 75 gr glukoz ile oral glukoz tolerans testi yapılması da öneriler arasındadır.

Yukarıda belirtilen kriterlerin yanında ADA 2009 yılı önerilerine göre diyabet ve prediyabet teşhisi için kan şekeri düzeyleri yanında, HbA1c değerlerinin de kullanılması yararlı olacaktır. HbA1c değerlerine göre diyabet tanı kriterleri aşağıda belirtilmiştir (187).

Bu kriterlere göre:

1. HbA1c değerleri<% 5,7 saptanan hastaların diyabet olmadığı,
2. HbA1c değerleri % 5,7–% 6,5 arasında saptanan hastaların prediyabet olduğu,
3. HbA1c değerleri % 6,5 ve/veya üzeri saptanan hastaların ise diyabet tanısı aldığı kabul edilir.

Tanı kriteri olarak HbA1c'nin kullanılması hastalara birçok avantaj sağlamaktadır. HbA1c kriterlerinin kullanılmasıyla; hastaların 3 aylık glisemik düzeyi değerlendirilerek, şeker yükleme testleri ve açlık kanı aldırma gibi zor ve hatalı sonuç olasılığı yüksek testlere bakılmaksızın, daha fazla sayıda hasta prediyabetik dönemde yakalanarak önleyici tedbirler alınması mümkün olmaktadır.

2.2.4.Diyabet Komplikasyonları

DM'nin birçok farklı organda görülebilen akut ve kronik komplikasyonları bulunmaktadır.

2.2.4.1.Akut Komplikasyonlar

2.2.4.1.1.Diyabetik Ketoasidoz

Plazma glukozu>250 mg/dl, arteriyel pH<7,30, serum bikarbonat<15 mEq/l ve orta/ağır derecede ketonüri ve ketonemi vardır (181).

2.2.4.1.2.Hiperozmolar Hiperglisemik Durum

Mental durum bozukluğu vardır, ağır hiperglisemi (plazma glukozu>600 mg/dl) ve serum ozmolalitesi artmıştır (>320 mOsm/kg).

2.2.4.1.3.Ciddi Hipoglisemi ve Nöroglikopeni

Plazma glukozu<50 mg/dl, hipoglisemi tedavisine rağmen bilinç bozukluğunun düzelmemesi veya tanımlanmış ya da şüpheli hipoglisemiye bağlı koma, konvülziyon, davranış bozukluğu (dezoryantasyon, ataksi, unstabil motor koordinasyon, disfaji) mevcuttur (181).

2.2.4.1.4.Laktik Asidoz

Laktik asidoz, vücutta laktik asit birikmesidir. Hücreler enerji olarak glukoz dışı yakıt kullandıklarında laktik asit üretirler. Eğer çok fazla laktik asit vücutta kalırsa, denge bozulur ve kişi kendini rahatsız hissetmeye başlar. Daha az sıklıkta görülen bu durum, sıklıkla tip 2 diyabetli kişileri etkiler (188).

2.2.4.1.5.Bakteri/Mantar Enfeksiyonları

Diyabetli kişiler cilt ve tırnaklarda sık olmak üzere tüm organlarda bakteriyel ve mantar kaynaklı enfeksiyonlara daha açık hastalardır.

2.2.4.2.Kronik Komplikasyonlar

2.2.4.2.1.Mikroanjiyopati

Mikrovasküler değişiklikler, diyabette birçok organ komplikasyonlarının patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır (nefropati, retinopati, nöropati ve diyabetik ayak sendromu).

2.2.4.2.1.1.Diyabetik Retinopati

DM, körlüğe neden olan ilk üç hastalık arasında yer almaktadır. Diyabetik retinopati, retinadaki küçük damarların uzun süreli hiperglisemiye bağlı olarak tahrip olması sonucu gelişir. Diyabet süresi 15 yıla ulaşan DM'lilerin % 2'sinde körlük ve % 10'unda ciddi görme kaybı geliştiği bilinmektedir (189). Diyabetik retinopati yetişkinlerde edinsel körlüğe neden olan bir etmendir. Diyabetli hastaların % 50'sinde en geç 10 yıl sonra, % 90'ında en geç 25 yıl sonra retinopati gözlenmektedir (190). Diyabetiklerin retinasında belirlenen biyokimyasal anormallikler hiperglisemi ile ilişkilidir ve PKC aktivasyonu (191), nonenzimatik glikasyon (192), artmış heksozamin sentezi (193) ve apopitoza neden olan büyüme

faktörlerinin aktivasyonunu içermektedir. Fazla ROS üretiminin bu anormalliklerin birçoğuna neden olabileceği ileri sürülmüştür (194).

2.2.4.2.1.2.Diyabetik Nöropati

Uzun süreli diyabetin, periferik ve otonom sinirlerde yol açtığı bozukluklardır. En sık görülen belirtiler ayaklarda (bazen ellerde) uyuşma, yanma, karıncalanma, ağrı ve güçsüzlüktür. Bu belirtilerin en sık görülen hali, distal simetrik polinöropati şeklindedir (189).

Diyabetik nöropatinin prevalansı diyabetin varlığı süresince artmaktadır ve % 10'dan (teşhisten 1 yıl sonra) % 50'ye (teşhisten 25 yıl sonra) kadar değişmektedir (195-197). Ortalama prevalans % 30'dur (198). Tip 1 diyabetle ilişkili nöropati daha hızlı bir progresyona ve daha kötü sonuçlara sahiptir (199). Hiperglisemi, insülin ve C-peptid eksikliği, azalmış endonöronal kan akışı, bozulmuş nöronal Na^+/K^+-ATPaz aktivitesi ve azalmış nitrik oksit (NO) üretimi gibi birçok neden altta yatmaktadır (200). Bu duruma, insülin benzeri büyüme hormonu ve sinir büyüme hormonu gibi nörotopik faktörlerde azalma eşlik etmektedir (197, 200). Mikroanjiyopatik değişiklikler de diyabetik nöropatinin gelişmesinde tipiktir (201).

2.2.4.2.1.3.Diyabetik Nefropati

Diyabetik nefropati, yapısal olarak glomerüler filtrasyon bariyerindeki değişimler (glomerüler endotel disfonksiyonu, bazal membran kalınlaşması ve podosit kaybı) ve mezengial hücrelerinin değişmesi ve sonrasında mezengial bölgede matriks birikmesi ile karakterizedir (202). Mezengiumda matriksin birikmesi, filtrasyon için uygun kapiller alanın azalması renal fonksiyonun ilerleyici kaybı ile sonuçlanmaktadır (203). Hem çevresel hem de genetik faktörler gelişen nefropati progresyon hızına etki etmektedir (204, 205).

2.2.4.2.1.4.Diyabetik Ayak Ülserleri

Diyabetlilerde hem periferik nöropati hem de iskemi sebebiyle ayak ülserleri ve sonucunda amputasyon endikasyonu sık görülmektedir. Çalışmalar, travmatik nedenler dışında, ayak amputasyonuna yol açan sebeplerin % 50'sinin diyabetten kaynaklandığını göstermektedir. Dünyada her 30 saniyede bir, diyabetik ayak ülseri nedeniyle bir hastanın ayağının kesildiği tahmin edilmektedir (189).

2.2.4.2.2.Makroanjiyopati

Ateroskleroz hayatta çok erken başlayan bir süreçtir. Hayatın ilk on yılında aortada, ikinci on yılında ise koroner arterlerde yağlı izlere rastlanmıştır (206). Bu süreç, duraklama ve şiddetlenme dönemleriyle beraber on yıllar boyunca aralıklı olarak gelişmektedir. Aterosklerozun karakteristiklerinden biri lezyonun fokal olarak oluşmasıdır. Kardiyovasküler hastalıkların prevalansı 30 yaşındaki diyabetli hastalarda 30 yaşındaki sağlıklı bireylere göre daha fazladır (% 10 diyabetik, % 2 sağlıklı) ve dahası önümüzdeki on yıl içerisinde prevalansın artması beklenmektedir (207).

2.2.4.2.2.1.Kardiyovasküler Hastalıklar

DM, KAH ve inme riskini 2-4 kat arttırmaktadır. Diyabetlilerin % 60-75'i kardiyovasküler hastalıklar (KAH ve inme) nedeniyle kaybedilmektedir (189). Diyastolik KY olan bireylerin % 37'si diyabettir (208) ve diyabet diyastolik KY ile birlikte olduğunda, sağkalımda 5 yıllık azalma görülmektedir (209).

2.2.4.2.2.1.1.Diyabetik Kardiyomiyopati

Kemirgenler başta olmak üzere birçok hayvan modeli üzerinde yapılan çalışmalarda DM'nin miyokardiyal fibrozis, miyosit hipertrofisi, miyokardiyal kontraktil proteinlerinde ve hücrede Ca^{+2} taşınmasında bozukluklara yol açtığı gösterilmiştir (210). Fizyopatolojisinde, metabolik substratlarda değişiklik, ROS ve kollajen formasyonunda artış olduğu da gösterilmiştir (211). Tüm bu anormalliklerin miyokardda yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olup DKMP gelişimine yol açtığı kabul edilmektedir (212).

Önemli komplikasyonlardan biri olan DKMP sistolik disfonksiyon gelişiminden önce oluşan diyastolik disfonksiyon ile karakterize, KAH veya hipertansiyondan bağımsız olarak ventrikül disfonksiyonu olarak tanımlanmaktadır (3, 5, 212-215). DKMP'nin ilerleyen safhasında KY gelişmektedir (212). DKMP histolojisinde, miyosit hipertrofisi, interstisyel fibrozis, miyokardiyal kapiller bazal membran kalınlaşması, intramiyokardiyal mikroanjiyopati bildirilmiştir (216). DKMP'de LV kütlesi artışı, LV duvar kalınlığı ve arter duvarı sertliği artışı ile azalmış sistolik fonksiyon gibi değişiklikler gözlenmektedir (217).

2.2.5.Diyabetik Kardiyomiyopati Fizyopatolojisi

Hiperglisemi, DKMP gelişiminde en önemli etiyolojik faktördür. Hiperglisemik hastalarda glikolize hemoglobinde (HbA1c) % 1'lik yükselme, KY gelişme riskinde % 8'lik artışa neden olmaktadır (218).

İnsülin direnci, kardiyovasküler hastalık gelişimi için önemli bir risk faktörüdür. KY de insülin direncine neden olur (219, 220). KY'nin insülin direncine neden olan olası mekanizmaları, sempatik aşırı aktivite, iskelet kas kütlesi kaybı, hareketsiz yaşam tarzı, tümör nekroz faktör-α (TNF-α) gibi dolaşımda artmış sitokinlerin potansiyel etkisidir (214, 221, 222). İnsülin sinyalizasyonunda en önemli adım intrasellüler

bölümden sarkolemmaya insülin duyarlı taşıyıcı protein glukoz taşıyıcısı 4 (GLUT 4) translokasyonu gibi görünmektedir (223).

Diyabette metabolik substrat değişiklikleri, GLUT 1 ve GLUT 4'te azalma gözlenmektedir. DM'de dolaşımdaki yüksek serbest yağ asitleri (FFA) pirüvat dehidrogenazı (PDH) inhibe ederek miyokardiyal enerji üretimini bozar ve glikolitik ara ürünler ve seramid birikimine neden olarak apopitozu arttırırlar (224, 225). DM'de peroksizom proliferatör aktivatör reseptörün (PPAR-α) artmış aktivitesi, pirüvat dehidrogenaz kinaz 4'ün, β oksidasyon ve FFA geri alınma regülasyonuyla ilgili diğer genlerin ekspresyonunu arttırır, glukoz oksidasyonunu azaltır. Yüksek kan ve hücre içi FFA düzeyleri hücre içinde toksik FFA ara ürünlerinin birikmesine neden olur (226, 227).

Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan ROS, hipertrofiden fibrozis, kontraktil disfonksiyon ve yetmezliğe kadar KY gelişmesinin tüm aşamalarından sorumlu tutulmaktadır (228). ROS artışı, protein ve DNA'da doğrudan hasar oluşturarak kardiyak disfonksiyona neden olmaktadır (229). ROS artışı kardiyomiyositlerde oksidatif hasara ve endotel hücrelerinde apopitoza neden olur (230, 231).

Miyokardiyal fibrozis ve kollajen birikimi DKMP'de gözlenen en önemli yapısal değişikliklerdir (232). Diyabet, lokal olarak miyokard renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi (RAAS) ve endotelin sistemlerini (233) aktive ederek miyosit nekrozu ve fibrozisine (234) neden olur. Diyabetli hastalarda gözlenen bozulmuş LV fonksiyonu (diyastolik ve sistolik), fibrozis, bozulmuş kollajen yapısı özellikle ileri glikasyon ürünlerinin (AGE) kollajen çapraz bağları arttırması sonucu gerçekleşmektedir (235, 236).

DKMP oluşumuna neden olan mekanizmalardan bir diğeri de Ca^{+2} homeostazisindeki bozulmadır. Diyabetik kalplerde PLB mRNA ve protein seviyelerinin arttığını (23, 24), farklı çalışmalarda PLB protein seviyelerinin özellikle aktif form olan fosforile PLB miktarının azaldığını (25, 26, 27), SERCA protein seviyelerinin daha belirgin azalıp PLB/SERCA oranının arttığını (24, 26) gösteren çalışmalar mevcuttur. SERCA aşırı ekspresyonunun Ca^{+2} taşınmasını iyileştirdiği (70) ve diyabetik kemirgenleri DKMP'ye karşı koruduğu gösterilmiştir (9).

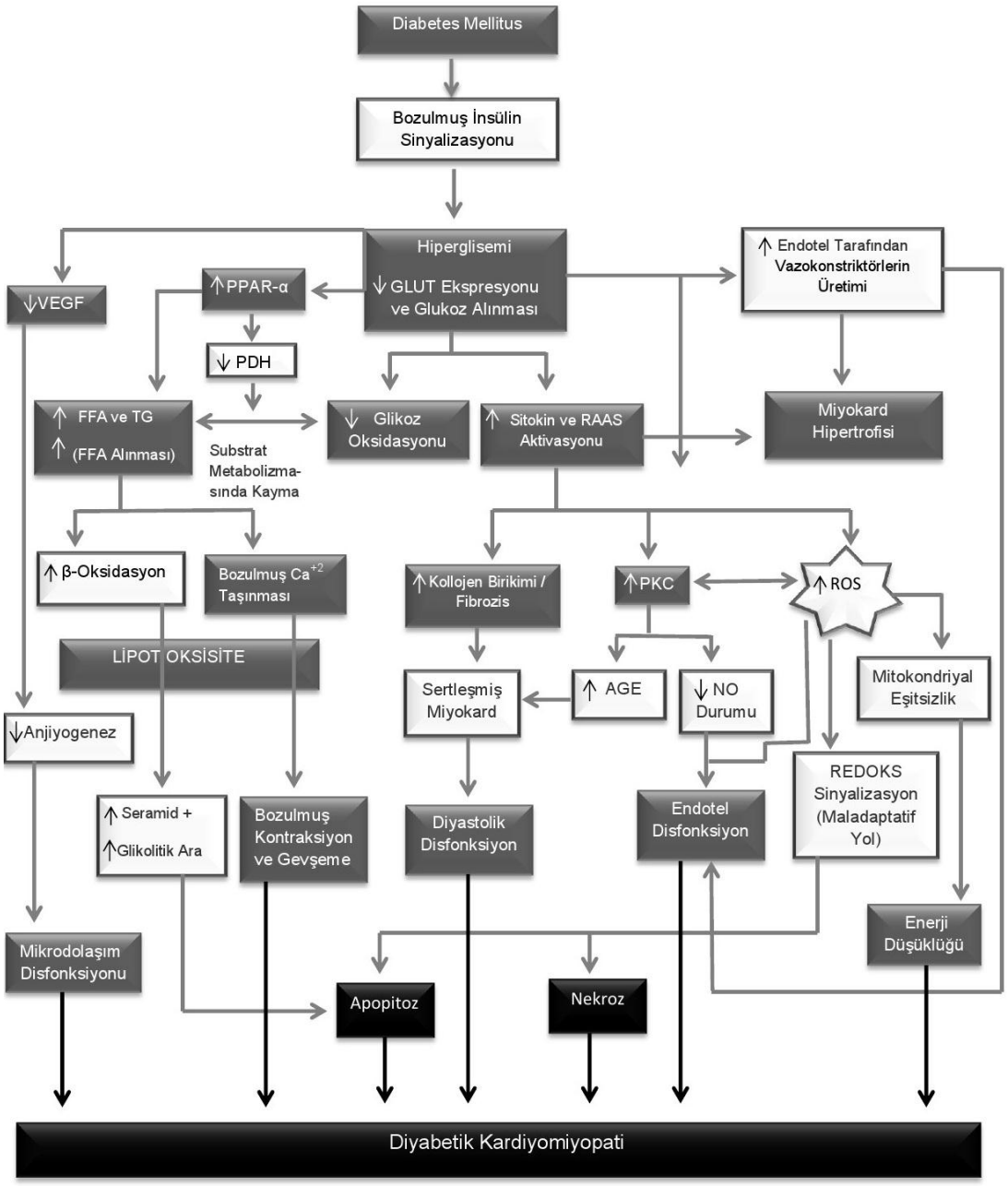
Poli-ADP riboz polimeraz (PARP) nükleer DNA tamir enzimidir. DNA'da artmış oksidatif stresin neden olduğu hasardan dolayı diyabette aşırı aktifleşir (237). Bunun yanısıra nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD) tükettiği için glikoliz ve ATP oluşum hızını azaltır, Gliseraldehit3-fosfat dehidrogenazı (GAPDH) inhibe ederek glikolitik ara ürünlerin birikimine neden olur (238). Bu yolla AGE ve PKC'nin aktivasyonundaki artışla (238) hücrede hasar artar, damarlarda endotelyal disfonksiyon gelişir (239).

Diyabetik kalplerde artmış PKC aktivitesi (240), artmış ROS (191) ve PARP (238) düzeyleri ile ilişkilidir. PKC-β2 izoformunun aşırı eksprese olduğu TG farelerin miyokardında kardiyak hipertrofi, fibrozis, ilerleyici kardiyomiyopati gelişimi gözlenmiştir (241).

Kardiyak otonom nöropati LV disfonksiyonu (242) gelişiminde önemli bir rol oynar ve diyabetik hastalarda artmış kardiyovasküler riskle ilişkilidir. Sempatik denervasyon DM'de kardiyak otonom nöropatinin önemli bir özelliğidir. Birçok çalışmada miyokardiyal perfüzyon anormallikleri gözlenmeksizin diyabetik hastalarda kardiyak otonom nöropatisi gösterilmiştir (243, 244).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) protein, mRNA ve reseptörlerinin (VEGF-R1, VEGF-R2) hem DM hem de DM olmayan insülin dirençli sıçanlarda anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir (213). DM'de gözlenen mikrosirkülasyon disfonksiyonun nedeni VEGF ekspresyonundaki azalma olabilir. DNA gen terapisi ile VEGF'nin arttırılması sonucu kardiyak fonksiyonlarda iyileşme, damar yoğunluğunda artış gösterilmiştir (245).

ROS'lerin artmış üretimi ve AGE'ler tarafından NO'nun inaktivasyonu (246) endotelyal bağımlı relaksasyonu bozar. DM'de gözlenen anormal vazodilatatör yanıt koroner mikrosirkülasyona kadar uzanır (247).



Şekil 2.12.DKMP'nin Patofizyolojik Mekanizmaları (4)

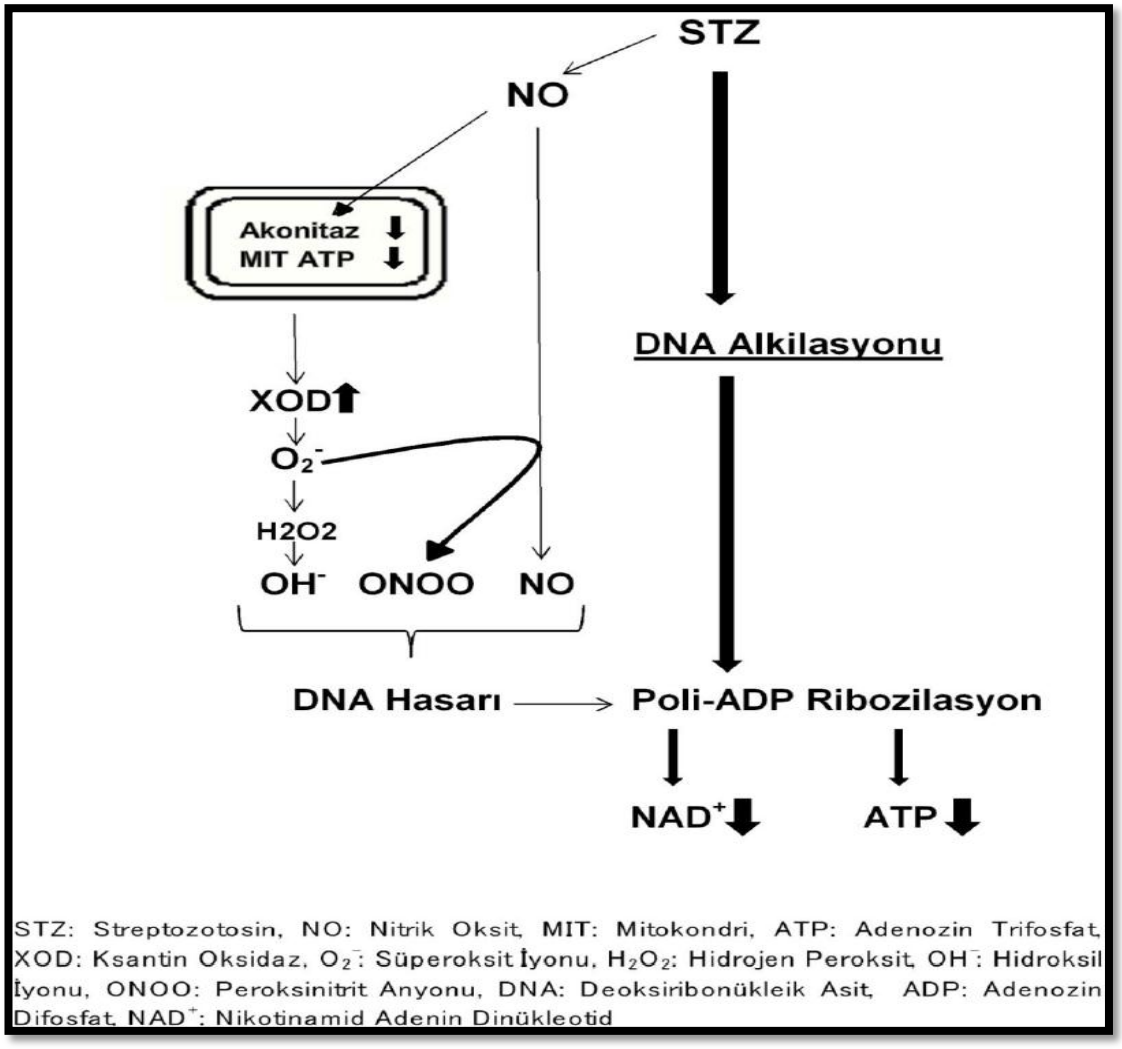
2.2.6.Streptozotosin ile Deneysel Tip 1 Diabetes Mellitus Oluşturulması

STZ, pankreas β hücreleri için sitotoksik olan ve hayvanlarda deneysel DM oluşturmak için kullanılan nitrozüre bileşiğidir (248). Streptomycetes achromogenes tarafından sentezlenir. Neoplastik, antineoplastik ve diyabetojenik özellikleri olan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. STZ, nötral pH'da hızla dekompanse olur, pH 4-4,5'te stabildir. Çözeltisi uygulamadan hemen önce, pH'si 4 olan sitrat tamponu içinde hazırlanmalı ve -20°C'de ışıktan korunarak saklanmalıdır (249). Sıçanlarda vücut ağırlığına göre 50-65 mg/kg dozda enjekte edilmektedir (250-253). STZ, GLUT 2 ile pankreas β hücreleri tarafından alınır (248, 249). STZ'nin diyabetojenik etkisinin GLUT 2 üretiminin azaldığı durumlarda ortadan kalktığı gözlenirken, multiple dozlarda uygulanan STZ'nin de GLUT 2 üretimini azalttığı gösterilmiştir (249).

Sıçanlarda STZ uygulamasından 2 saat sonra kan glukoz düzeyinde artış ve 6 saat sonrasında kandaki insülin düzeyindeki yükselmeye bağlı hipoglisemi gözlenmektedir. Son olarak insülin düzeyindeki azalmaya bağlı gelişen hiperglisemi ile STZ'nin diyabetojenik etkileri kendini gösterir. STZ'nin glukoz oksidasyonu, insülinin biyosentezi ve sekresyonunu azalttığı bildirilmiştir (249).

STZ'nin hedefi pankreas β hücresindeki DNA'dır. STZ'nin hücre içinde nitrozüre gruplarının dekompozisyonu ile oluşan reaktif karbonyum iyonları DNA bazlarında alkilasyona neden olur (249). STZ'ye bağlı oluşan DNA hasarında STZ'nin metabolize olduğunda açığa çıkardığı NO etkisinin de rolü olduğu ileri sürülmektedir. β hücrelerine alınan STZ, NO'nun hücre içinde serbest kalmasına, dolayısıyla DNA ayrılmasına sebep olmaktadır (248, 249, Şekil 2.13). STZ'nin DNA parçalanmasına neden olan ROS'yi ürettiği tespit edilmiştir. Artmış ATP defosforilasyonu, ksantin oksidaz (β hücreleri bu enzimin yüksek aktivitesine sahiptir) üretimini arttırır (248). Ksantin oksidaz inhibitörlerinin in vitro STZ etkisini kısıtladığı gösterilmiştir (249). Ayrıca, ksantin oksidaz süperoksit anyonunun oluştuğu reaksiyonu da katalize eder. Süperoksit anyon üretiminin bir sonucu olarak, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri oluşur. STZ'nin en önemli alkilleyici özelliklerinin, toksisitesinin başlıca nedeni olduğu söylenebilir ancak, hem NO hem

de ROS'nin sinerjistik etkisi de DNA fragmantasyonuna katkıda bulunabilir. NO ve ROS ayrı ayrı hareket edebilir ve aşırı toksik olan peroksinitrat (ONOO) oluşturabilir. Hücre içi antioksidanlar veya NO sürükleyicileri büyük ölçüde STZ toksisitesini azaltmaktadır (248). Bunu DNA tamiri izler ve tamir sırasında görev alan PARP hücre içindeki NAD'yi kullanarak NAD depolarını boşaltır ve ATP içeriğini azaltır. Böylece hücresel enerji depolarının tükenmesi β hücresinde nekroza yol açar. NAD ve PARP inhibitörleri ile tedavi, STZ'nin diyabetojenik etkilerine karşı koruyucudur (248, 249).



Şekil 2.13. STZ'nin Pankreas β Hücresi Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Mekanizması (248)

STZ ve diğer nedenlere bağlı gelişen tip 1 ve tip 2 DM'de gözlenen kardiyak anormallikler Tablo 2.4, Tablo 2.5'te özetlenmiştir.

Tablo 2.4. Tip 1 ve Tip 2 Diyabetik Kemirgen Modellerinde Gözlenen Anormallikler (254)

	STZ	**OVE 26**	**Akita**	**ob/ob**	**db/db**	**ZDF**
Kardiyak Hacim	=		↓ / =	↑	↑	↑
Kardiyak Fonksiyon	↓	↓	↓	↑ / ↓	↓	↓
Kardiyak Verim	↓		=	↓	↓	=
Mitokondri Enerji Eldesi	↓	↓	↓	↓	↓	
Lipit Depolama	↑			↑	↑	↑
Yağ Asidi Oksidasyonu	↑		↑	↑	↑	↑
Glukoz Oksidasyonu	↓		↓	↓	↓	↓
Ca^{+2} Taşınması	↓	↓	↓	↓	↓	=
Oksidatif Stres	↑	↑		↑	↑	

Yukarı ve aşağı oklar sırasıyla, artış ve azalışı ifade etmektedir. STZ, Streptozotosin; OVE 26, β Hücrelerinde Kalmodulin Aşırı Ekspresyonu; Akita Fare, Non-Obez Mutant Fare; ob/ob Fare, Leptin Gen Defektli Fare; db/db Fare, Leptin Reseptör Gen Defektli Fare; ZDF, Zucker Diyabetik Fatty Sıçan.

Tablo 2.5. Tip 1 ve Tip 2 Diyabetik Kemirgen Modellerinde Gözlenen Kardiyak Anormallikler (3)

	Tip 1 Diabetes Mellitus					**Tip 2 Diabetes Mellitus**			
	OVE 26	**NOD**	**BB Rat**	**STZ**	**Alloksan**	**ob/ ob**	**db/ db**	**ZF/ ZDF**	**GK**
Kalp Hızı			↓						
Sistolik Fonksiyon	↓	↓		↓	↓		↓	↓	
Diyastolik Fonksiyon	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	
LV Hipertrofisi						↑			↑
± dP/dt		↓	↓	↓		↑	↑	↑	
İnotropik Yanıt					↓	↓			
İskemiye Tolerans			↓	↓	↑	↓		↓ ↑	↑

Yukarı ve aşağı oklar sırasıyla, artış ve azalışı ifade etmektedir. OVE 26, β Hücrelerinde Kalmodulin Aşırı Ekspresyonu; NOD, Non-Obez Diyabetik; BB Rat, BioBreeding Sıçan; STZ, Streptozotosin; ob/ob Fare, Leptin Gen Defektli Fare; db/db Fare, Leptin Reseptör Gen Defektli Fare; ZF/ZDF, Zucker Fatty Diyabetik Fatty Sıçan; GK, Goto-Kakizaki Sıçanı.

2.3.Hipoksi

Hipoksi, genel bir tanım olarak hücrelere oksijen (O_2) temininin veya hücrelerde O_2 kullanılmasının azalmasıdır. Hipoksinin temel nedenleri olarak, azalmış alveolar parsiyel O_2 basıncı (PAO_2), azalmış difüzyon kapasitesi, dolaşım yetmezliği, hemoglobinin taşıma kapasitesi sayılabilir.

2.3.1.Yüksek İrtifada İnspirasyon Havası PO_2 Değişiklikleri

Yükseklik artışıyla beraber inspirasyon havası PO_2 (mmHg) değişiklikleri Tablo 2.6'da özetlenmiştir.

Tablo 2.6. Yükseklik Artışıyla Beraber İnspirasyon Havası PO_2 (mmHg) Değişiklikleri (255)

Metre	Feet	İnspirasyon Havası PO_2 (mmHg)
0	0	149
1.000	3.281	132
2.000	6.562	117
3.000	9.843	103
4.000	13.123	90
5.000	16.404	78
6.000	19.685	67
7.000	22.966	58
8.000	26.247	51
9.000	29.528	42

2.3.2.Hipoksi Çeşitleri

Akut, aralıklı ve kronik olmak üzere 3 tip hipoksi tanımlanmaktadır.

2.3.2.1.Akut Hipoksi

Yüksekliğe akut maruziyetin insan fizyolojisi üzerine artmış sempatik aktivite sonucu kalp frekansında ve kontraktilitesinde artış, koroner arter dilatasyonu, azalmış kalp atım hacmi, artmış kalp debisi ve pulmoner vazokonstriksiyon gibi etkileri bulunmaktadır. Yüksekliğe akut maruziyette koroner arter hastalığı olan kişilerde parasempatik etkinin azalıp sempatik etkinin artmasından dolayı kardiyak aritmi riski

fazladır. 60-110 mmHg arası PaO_2 fizyolojik düzey olarak kabul edilir. 60 mmHg'nin altında kardiyak ve ventilatuar yanıtlar artar. Genellikle 66 mmHg düzeyindeki PaO_2'nin sıçanlarda ve kedilerde dramatik şekilde cevapları indüklediği gösterilmiştir. Yüksekliğe bağlı hipokside kompansatuar hiperventilasyondan dolayı PaO_2 düşüşüne $PaCO_2$ düşüşü de eşlik eder. Sempatik aktivasyonun ve hipoksinin direkt etkilerinin kombinasyonu sonucu periferal vasküler dirençte ani bir düşüş meydana gelir. Bu da iskelet, beyin ve kardiyak sirkülasyonun dilatasyonu, renal ve splanknik damarlarda değişiklik olmaması veya vazokonstriksiyonla kendini gösterir (20).

2.3.2.2.Aralıklı Hipoksi

AH, normoksi dönemleri ile bölünen, tekrarlayıcı hipoksi dönemleridir ve süresi haftalarla sınırlıdır.

3 tip AH vardır (256).

TİP 1: 10-90 sn süren hipoksi dönemleri arasında birkaç dakika süren normoksi dönemleri yer alır. Daha çok uyku apneli hastalarda görülür.

TİP 2: Hipoksi ve normoksi dönemleri dakikalar veya saatler sürer. Daha çok yüksek irtifaya hızlı çıkarken ve inerken görülür.

TİP 3: Hiperventilasyon dönemlerini birkaç saniyeden birkaç dakikaya kadar süren apneler takip eder.

Artmış miyokardiyal perfüzyon, hipertrofiden bağımsız artmış LV kasılabilirliği, infarktüs sonrası azalmış ventriküler aritmi insidansı, infarktüs sonrası kontraktil fonksiyonun iyileştirilmesi, sağ ve sol ventrikülde artmış damarlanma ve reperfüzyon hasarlarına karşı artmış miyokardiyal koruma AH'nin kalp üzerindeki başlıca yararlı etkileridir. AH'nin reperfüzyon yaralanmasından kalbi koruduğu bilinmektedir. Aralıklı hipoksik önkoşullamanın da kalp koruyucu etkisi bulunmaktadır (20).

2.3.2.3.Kronik Hipoksi

Kronik hipokside bir aydan fazla devamlı olarak hipoksiye maruziyet söz konusudur. Kronik hipoksi artmış koroner damarlanmaya, artmış miyoglobin miktarına, azalmış infarkt alanına, infarktüs sonrası azalmış ventriküler aritmi insidansına, infarktüs sonrası kontraktilitede iyileşmeye, dinlenme durumunda azalmış koroner kan akımına ve miyokardın enerji, yani O_2 kullanımını azaltan diğer değişikliklere neden olmaktadır. Yükseklerde yaşayan insanlarda deniz seviyesinde yaşayanlara kıyasla daha fazla vaskülarizasyon gözlenmektedir. Kronik hipoksi sıçan kalplerinin iskemiye toleransını arttırmaktadır. 3.500 m'de yaşayanların deniz seviyesinde yaşayanlara kıyasla koroner kan akımının daha düşük, laktat ve pirüvatın miyokard tarafından tüketiminin daha fazla ve O_2 kullanımının daha verimli olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular kronik olarak yüksekte yaşayanların bazal O_2 kullanımının düşük olduğunun delilidir (20).

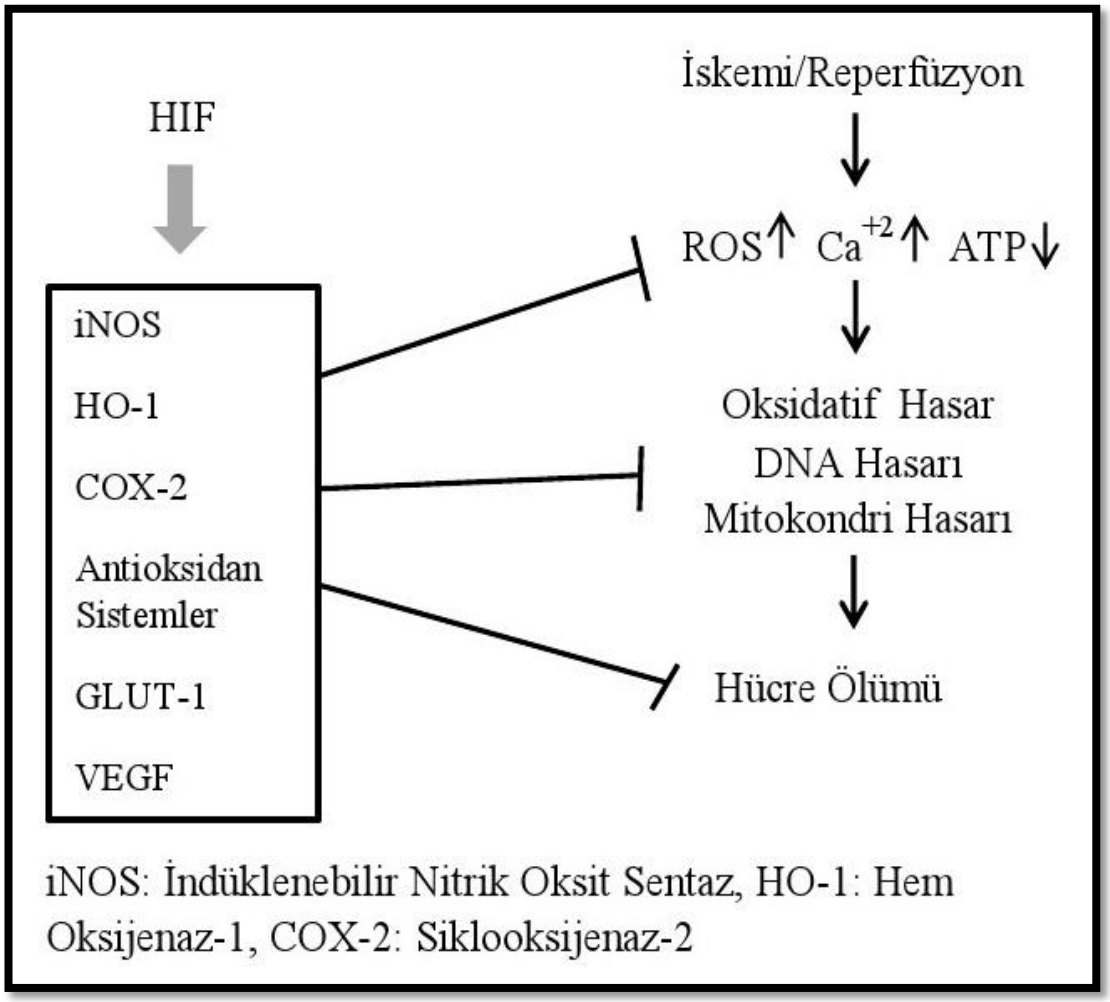
2.3.3.Hipoksik Ön Koşullandırma

Hipoksik ön koşullandırma; hücreler, dokular için stresli fakat onlara zarar vermeyen, tam aksine zararlı bir uyarana karşı adaptasyon sağlayarak zararlı etkileri azaltan bir durumdur (257). Hipoksik ön koşullandırma kalbi, beyni ve retinayı iskemiyi de içeren çeşitli yaralanmalara karşı korumaktadır (258).

2.3.3.1.Hipoksik Ön Koşullandırma ve HIF (Hipoksiyle İndüklenen Faktör)

Hipoksik ön koşullandırma ile indüklenmiş koruyucu etkinin, HIF izoformlarının ve etkilediği hedef genlerin indüksiyonu ile olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.14). Sistemik hipoksinin hipoksik ön koşullandırmaya neden olduğu, neonatal ve erişkin farelerde beyni iskemiye karşı HIF-1α düzeyini arttırarak koruduğu gösterilmiştir (259, 260). Ayrıca eritropoetin (EPO) ve VEGF gibi genlerin indüksiyonunun tek başlarına beyni iskemiye karşı koruduğu da bildirilmiştir (261, 262).

GLUT 1 aşırı ekspresyonunun in vitro ve in vivo ortamda hücreleri iskemi ve diğer yaralanmalara karşı koruduğu gösterilmiştir (263). Hipoksik ön koşullandırma ile HIF'nin etkileri Şekil 2.14'de gösterilmiştir.



Şekil 2.14. I/R Karşısında HIF ve Etkilediği Moleküllerin Etkileri (264)

2.3.4.İskemik Ön Koşullandırma

İskemik ön koşullandırmanın insanlarda infarkt alanını azalttığı, koroner kan akımını arttırdığı, apopitozu, doku ödemini azalttığı gösterilmiştir. Aritmiler, inotropik gereksinimler, kalp cerrahisi sonrası yoğun bakımda kalma süresi azalmaktadır (20).

2.3.5.AH ve Ca^{+2} Homeostazisi

I/R'de intraselüler Ca^{+2}'nin çok fazla arttığı bilinmektedir. AH'nin, kalbi Ca^{+2} artışından kaynaklanan ölümcül yaralanmaya karşı koruduğu gösterilmiştir (265). I/R'ye maruz bırakılan normoksik farelerde, fosforile PLB ve CaMKII aktivitesinin düşük bulunduğu ve AH uygulaması ile kontrol değerlerine geri döndüğü gözlenmiştir (26). AH, preiskemik koşullarda hücre kısalmasına ve Ca^{+2} geçişlerine etki etmezken, I/R ile indüklenen hücre içi Ca^{+2} miktarı artışını önemli ölçüde baskılamıştır (266). İskemik önkoşullandırmanın I/R ile indüklenmiş SR'ye Ca^{+2} taşınma bozukluğuna yararlı etkileri olduğu gözlenmiştir (267, 268). PLB'nin hem Ser^{16} hem de Thr^{17}'den fosforilasyonundaki değişikliklerin, iskemi sonrası kontraktil iyileşmede rol oynadığı gösterilmiştir (269). AH ile indüklenmiş artmış Thr^{17} fosforilasyonunun CaMKII inhibitörü olan KN-93 tarafından inhibe edilmesi fonksiyonel iyileşmeyi bozmaktadır. Bu sonuçlar, Ser^{16} ve/veya Thr^{17} fosforilasyonu mutasyonunun, iskemi sonrası kontraktil iyileşmeyi azalttığını göstermektedir (269). PKA ve CaMKII inhibitörleri tarafından indüklenmiş SR Ca^{+2} geri alınmasındaki azalmanın PLB antikoru tarafından önlenebileceği gösterilmiştir (270). PKA ve CaMKII yolları üzerinden PLB fosforilasyonu, SERCA aktivitesini düzenler ve AH'nin kardiyoprotektif etkisinde önemli bir rol oynar.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Deney Hayvanları

Deney hayvanı olarak 34 adet, 10 haftalık, Wistar Albino cinsi, erkek sıçanlar kullanıldı. Denekler, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Yetiştirme ve Temini Laboratuvarı'ndan temin edildi. Ortama adaptasyonları amacı ile deneyler başlamadan bir hafta önce, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Hayvan Laboratuvarı'na getirilen, 10 haftalık, Wistar Albino rattus norvegicus deney hayvanları +22°C'lik klimatize ortamda, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusta serbest şekilde standart sıçan yemi (ad libitum) ve musluk suyu ile beslendiler. Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 23.05.2012 tarih ve 2012-11-79 karar numarası ile alınan etik kurul onayı EK-1'de sunulmuştur.

3.2.Deney Grupları

Bir haftalık laboratuvara adaptasyon dönemini takiben ağırlıkları ve kan glukoz düzeyleri ölçülen denekler rastgele (randomize) kontrol (K), aralıklı hipoksi (AH), diabetes mellitus (DM) ve diabetes mellitus + aralıklı hipoksi (DM+AH) olmak üzere 4 gruba ayrıldılar. Deney grupları, denek sayıları ve her deney grubu için deneklerin ortalama ağırlıkları ($\bar{X}$±SS) Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Deney Grupları, Denek Sayıları ve Laboratuvara Geliş Ağırlıkları

Deney Grupları		Denek Sayısı (n)	Ortalama ± Standart Sapma Ağırlıkları ($\bar{X}$±SS)
1	Kontrol (K)	7	209,71±11,01
2	Aralıklı Hipoksi (AH)	9	210,11±16,27
3	Diabetes Mellitus (DM)	8	232,25±19,41
4	Diabetes Mellitus + Aralıklı Hipoksi (DM+AH)	10	219,20±17,75

Deneysel DM oluşturmak için 11. haftada Tablo 3.1'de geçen DM ve DM+AH gruplarına, 50 mg/kg tek doz intraperitoneal (i.p.) taze sitrat tamponda (0,05 M, pH=4,5) hazırlanmış STZ enjekte edildi. STZ enjeksiyonundan bir hafta sonra (12. hafta) glikometri cihazı (Optium Xceed, Abbott) ile deneklerin kan glukoz seviyeleri ölçüldü. Kan glukoz seviyeleri 250 mg/dL ve/veya üzeri olan sıçanlar DM kabul edildi (271). 12. haftadan itibaren AH ve DM+AH gruplarındaki denekler 6 hafta süresince, günde 6 saat, 3.000 m'ye karşılık gelen 69,3 kilopaskal (kPa, 520 mmHg) basınçta hipobarik hipoksik kamarada (APCU-01, Betlehem) tutuldular. Hipobarik hipoksi uygulamaları düzenli olarak hergün 09:00-15:00 saatleri arasında yapıldı. Deney protokolünün son uygulamasından 24 saat sonra (43. gün) sakrifikasyon işlemi uygulandı. Hipoksi uygulanmayan gruplardaki (K ve DM) denekler aynı süreyle kafeslerde takip edildi. Tüm deneklerin günlük ağırlık, haftalık kan glukoz takibi ve bakımları yapıldı.

3.3.Dokuların Alınması

Tartıldıktan sonra deney hayvanlarına anestezi için 50 mg/kg dozunda, i.p. tiopental sodyum uygulandı. 10 dakika içinde ağrılı uyarana (dişli penset ile arka ayaktan) cevap alınmadığında sakrifikasyon işlemine başlandı. Cerrahi masada göğüs kafesleri açıldı. Sternum ve kostalar ekarte edilerek kalp çıkarıldı ve denekler ötenazi edildi. Çıkarılan kalp, sağ ve sol ventrikül olarak ayrıldı. Elde edilen dokular ependorf tüplerine yerleştirilerek sıvı azotta dondurulduu. Dokular moleküler çalışmalar yapılıncaya kadar -80°C'de (MDF-U73V, SANYO) saklandı.

3.4.Dokuların Homojenizasyonu ve Total RNA Eldesi

Moleküler çalışmaların yapılabilmesi için doku örneklerinden total RNA elde edildi.

3.4.1.Kullanılan Gereç ve Kimyasallar

1. Homojenizatör (Glas-Col, 099C-K5424)
2. Sıvı azot taşıma kabı
3. Sıvı azot
4. Porselen havan
5. Tek kullanımlık laboratuvar eldiveni (Skintex, pudralı, small, medium, large)
6. Kar makinesi (Ziegra ZBE30-10)
7. Leğen (Buz koymak için)
8. 21 numara bistüri ucu
9. Penset (Bistüri ile keserken dokuyu tutmak için)
10. Beher (100 ve 250 ml)
11. Soğutmalı mikrosantrifüj (Hettich Zentrifugen, D-78532, Mikro 200R)
12. Sıcak su banyosu (İnkübasyon için, Şimşek Laborteknik)
13. 0,1-2 µl, 2-20 µl, 20-100 µl ve 200-1000 µl kapasiteli otomatik pipetler
14. Steril, ribonükleazdan (RNase) arındırılmış pipet uçları
15. 1,5 ml hacimli ependorf tüpler
16. Ependorfları yerleştirmek için spor

17. Etil alkol (% 99)
18. 14,3 M β-merkaptoetanol (β-ME)
19. Vortex (Labnet, SO100-23V-EU)
20. Hassas terazi (Kern ABS 220-4, WB0710166)
21. Total RNA İzolasyon Kiti (Qiagen Fibrous Tissue Mini Kit K74704)

Total RNA İzolasyon Kiti (Qiagen Fibrous Tissue Mini Kit K74704) içeriği şu şekildedir:

1. RLT tamponu (Guanidiyum Tiyosiyanat içerir, 45 ml)

2. RPE tamponu (Konsantre, 11 ml)

3. RW1 tamponu (Etanol içerir, 45 ml)

4. Proteinaz K (Proteinleri denatüre eder, 2 ml)

5. RNeasy mini spin kolonlar (50 adet)

6. 1,5 ml toplama tüpü (50 adet)

7. 2 ml toplama tüpü (50 adet)

8. Ribonükleazdan arındırılmış su (4×10 ml)

9.Ribonükleazdan arındırılmış deoksiribonükleaz (DNase) seti (DNA'ları denatüre eder) içeriği:

- RDD tamponu (2 ml)
- RNase Free DNase I (1 tüp, 1500 ünite)
- Ribonükleazdan arındırılmış su (1,9 ml)

Ribonükleazdan arındırılmış DNase seti, bozulmaması için +4°C'de saklandı.

3.4.2.Ön Hazırlık Basamakları

Sıcak su banyosu +55°C'ye ayarlandı.

1. Çalışma tezgahları steril ortamın sağlanması amacıyla % 70'lik metil alkolle temizlendi.
2. Soğutmalı mikrosantrifüj +22°C'ye ayarlandı.

3.4.3.Homojenizasyon ve Total RNA Eldesi Basamakları

1. 1 ml RLT tamponuna 10 µl β-ME eklendi.

2. Konsantre olan RPE tamponuna (10 ml) hacminin 4 katı kadar (40 ml) etil alkol eklendi.
3. Liyofilize DNase [1500 Kunitz ünite (1 mg=2500 Kunitz ünite)] üzerine 550 µl ribonükleazdan arındırılmış su eklendi. Tüp yavaşça ters düz edilerek karıştırılıp DNase I stok solüsyonu hazırlandı ve derin dondurucuda (-20°C) saklandı.
4. -80°C'deki dokular sıvı azotla dolu taşıma kabına konuldu.
5. Çalışılacak doku örneği ependorf tüpünden çıkarıldı ve 21 numara bistüri ucu ile doku örneklerinden hızlıca hassas terazide tartılarak 60-100 mg kadar alındı.
6. Alınan doku örnekleri porselen havanda sıvı azot eklenerek ezildi.
7. Ezilen dokular sıvı azot varlığında homojenizasyon tüpüne aktarıldı.
8. Tüpler buz içine konuldu. Sıvı azot uçtuktan sonra homojenizat tüplerine 300 µl RLT tampon ve β-ME karışımı pipetlendi.
9. Homojenizasyon işlemi sırasında oluşan sıcaklık artışı, total RNA'da bozulmaya neden olabileceği için homojenizasyon tüpü kar dolu cam beher (250 ml'lik) içine yerleştirildi. Homojenizasyon 2 dakika, 30 dönüş/dakika (rpm) hızda yapıldı (Glas-Col, 099C-K5424).
10. 590 µl ribonükleazdan arındırılmış su, homojenizata eklendi.

11. 10 µl proteinaz K, homojenizat üzerine eklendi ve homojenizat pipetajla karıştırıldı.
12. Homojenizat dışarı taşırılmadan dikkatli bir şekilde ependorf tüpüne aktarıldı.
13. Ependorf tüpün kapağının etrafı parafilm ile kapatılıp su banyosunda +55°C'de 10 dakika inkübe edildi.

14. Parafilmler çıkartılıp tüp 10000 g'de 3 dakika +22°C'de santrifüj edildi.

15. Süpernatantlar (yaklaşık 900 µl) yeni ependorf tüpüne pipetlendi.

16. Süpernatant hacminin yaklaşık yarısı kadar (450 µl) etil alkol ilave edildi ve pipetajla karıştırıldı.

17. 2 ml'lik toplama tüpü içine yerleştirilmiş olan mini spin kolon membranına, süpernatant ve etil alkol karışımından yaklaşık 700 µl pipetlendi. +22°C'de 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı.

18. Süpernatant ve etil alkol karışımından kalan miktarla 17. basamak tekrar edildi.

19. RW1 tamponundan 350 µl, mini spin kolon membranına pipetlendi. +22°C'de 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı.

20. 10 µl DNase I stok solüsyonu 70 µl RDD tamponuna ilave edilip tüp dikkatli bir şekilde ters düz edilerek karıştırıldı.

21. 80 µl DNase I ve RDD tampon karışımı mini spin kolon membranına pipetlendi. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyon için beklendi.

22. RW1 tamponundan 350 µl, mini spin kolon membranına pipetlendi. +22°C'de 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü atılıp, mini spin kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi.

23. Etil alkol ile dilüe edilmiş RPE tamponundan 500 µl, mini spin kolon membranına pipetlendi. +22°C'de 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpüne biriken sıvı atıldı.

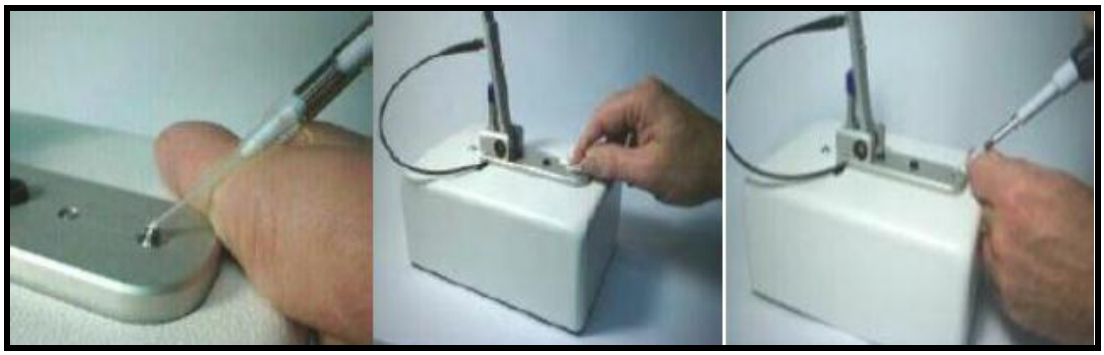
24. Etil alkol ile dilüe edilmiş olan RPE tamponundan 500 µl, mini spin kolon membranına pipetlendi. +22°C'de 8000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Mini spin kolon ependorf tüpüne yerleştirildi.

25. 45 µl ribonükleazdan arındırılmış su, mini spin kolon membranına pipetlendi. +22°C'de 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

26. Santrifüj sonrası elde edilen total RNA -20°C'de saklandı.

3.5.Total RNA Konsantrasyonu Ölçümü ve Kalitesinin Kontrolü

Elde edilen total RNA örneklerinden 2 µl kullanılarak ikişer kez absorbans ölçümleri spektrofotometrede (NanoDrop, ND-1000, Şekil 3.1) yapıldı. 230, 260 ve 280 nanometre (nm) dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldü (A230, A260, A280).



Şekil 3.1. Total RNA'ların Elde Edildiği Spektrofotometre (NanoDrop, ND-1000)

Değerlendirmede:

1. Nükleik asitlerin maksimal ışık absorbansı 260 nm'dedir. RNA'nın 260 nm'de ölçülen 1 optik dansitesi 40 µg/ml'ye eşittir. Buna göre, örneklerin total RNA konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

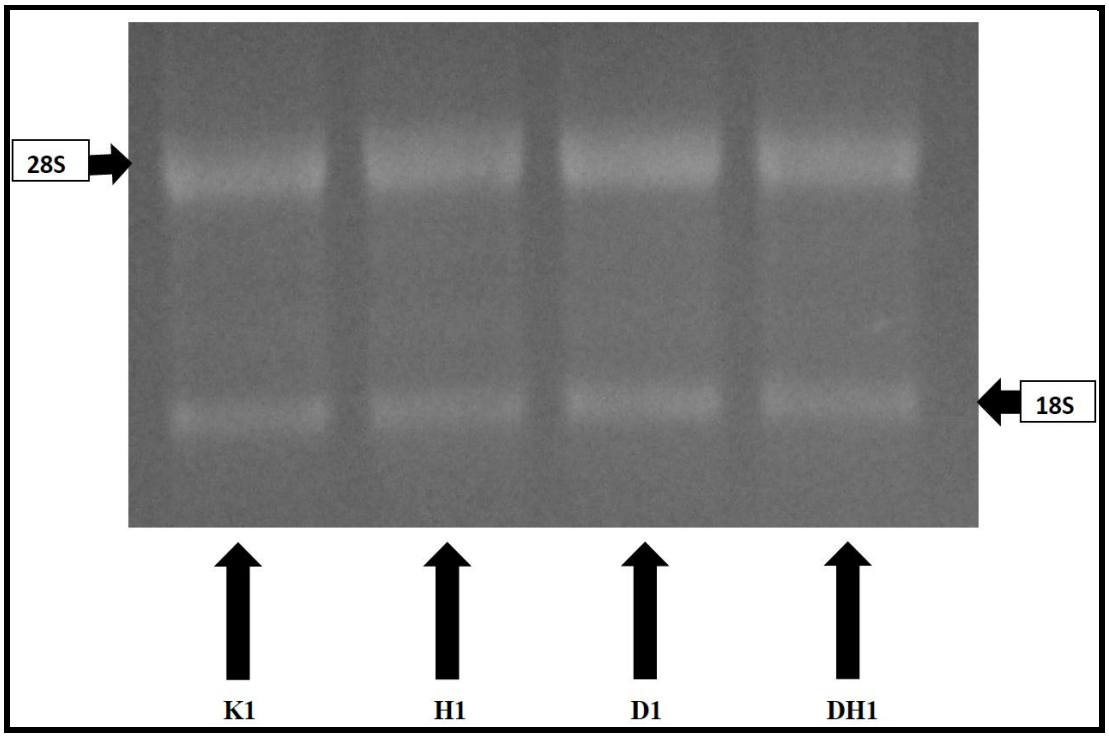
40xA260=RNA konsantrasyonu (µg/ml)
Konsantrasyonu 200 ng/ml ve üzeri olan örnekler ileri basamaklarda kullanıldı.

2. Proteinler ve özellikle aromatik aa'lar 280 nm dalga boyunda güçlü absorbans verirler. Çalışmada protein kontaminasyonunun değerlendirilmesi amacıyla A260/A280 oranına bakıldı. 1,8 ve üzeri orana sahip örnekler saf kabul edilip ileri basamaklarda kullanıldı.

3. Fenolat iyonu, tiyosiyanat ve başta polisakkaritler olmak üzere organik diğer bileşikler 230 nm dalga boyunda güçlü absorbans verirler. Çalışmada kontaminasyonun değerlendirilmesi amacıyla A260/A230 oranına bakıldı. 1,5 ve üzeri orana sahip örnekler saf kabul edilip ileri basamaklarda kullanıldı.

Konsantrasyonu, A260/A280 ve A260/A230 değerleri kriterlere uymayan örnekler için kalan dokulardan homojenizasyon ve total RNA'ların intakt kaldığını göstermek amacıyla her örnekten 1000 ng alınarak % 1'lik agaroz jelde 1 saat boyunca 100 voltta yürütüldü ve ultraviyole kamerada görüntülendi. 28S ve 18S RNA bantlarının görülmesiyle total RNA'da hasarlanma olmadığı kabul edildi. İntakt bantlarının görüldüğü örnekler Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Örnekler sonraki basamaklarda

kullanılırken, bu bantların görülmediği örneklerde homojenizasyon aşamasından itibaren işlemler tekrar yapıldı.



Şekil 3.2. 28S ve 18S RNA Bantları

3.6.Komplementer Deoksiribonükleik Asit (cDNA) Sentezi

Elde edilen total RNA içeriği mesajcı RNA (mRNA), transfer RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA) başta olmak üzere küçük nükleer RNA (snRNA), küçük nükleolar RNA (snoRNA), küçük kajal RNA (scaRNA), mikroRNA (miRNA), küçük interferans RNA (siRNA) ve diğer kodlama yapmayan RNA'lardan oluşmaktadır. Ribozomda fonksiyon gören rRNA hücresel RNA'nın % 75-80 kadarını oluşturur ve sedimantasyon hızına göre prokaryotlarda 23S, 16S ve 5S; ökaryotlarda ise 28S, 18S ve 5S şeklinde sınıflandırılır. Ribozomlara aa transferinde işlev gören tRNA yaklaşık % 20-25 iken; translasyonda proteine kalıp olarak kullanılacak olan mRNA, total RNA'nın % 1-5'ini oluşturur.

Total RNA'daki PLB, CaMKII ve GAPDH mRNA ekspresyon düzeylerini kantitatif olarak ölçmek için birkaç yöntem kullanılabilmektedir. Yapılan çalışmada

kullandığımız yöntem; ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) ile total RNA'dan cDNA'nın sentezlendiği ve bundan istenilen DNA dizisinin PCR ile çoğaltılabildiği ve PCR sonrası elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntülerinin analizi yöntemidir.

3.6.1.RT-PCR İçin Kullanılan Gereç ve Kimyasallar

1. Sıcaklık döngüleyici (Thermocycler, PCR cihazı, Techne TC 412)
2. Soğutmalı mikrosantrifüj (Hettich Mikro 200R)
3. 0,1-2 µl, 2-20 µl ve 10-100 µl kapasiteli otomatik mikropipetler
4. Steril, ribonükleazdan arındırılmış pipet uçları
5. 200 µl kapasiteli steril, ribonükleazdan arındırılmış PCR tüpleri
6. Tek kullanımlık laboratuvar eldiveni
7. Kar makinesi (Ziegra ZBE30-10)
8. PCR tüplerinin üzerine konulup çalışılacağı bloklar
9. cDNA sentez kiti (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, K1622, Fermentas)

Kit içeriğinin ayrıntısı:

a) Ters Transkriptaz (RevertAid Reverse Transcriptase, 200 u/µl, 120 µl)
b) Ribonükleaz İnhibitör (RiboLock RNase İnhibitor, 20 u/µl, 120 µl)
c) Reaksiyon Tamponu (5X Reaction Buffer, 500 µl)
d) 10 mM dNTP Karışımı (dGTP, dATP, dTTP, dCTP, 250 µl)
e) Başlatıcı Primer (Random Hexamer Primer, 0,2 µg/µl, 120 µl)
f) Nükleazdan arındırılmış su (1,25 ml)

Kit üreticiden temin edildikten sonra derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edildi.

3.6.2.Ön Hazırlık Aşaması

1.Soğutmalı mikrosantrifüj +4°C'ye ayarlandı.
2.Çalışma yapılacak alan steril koşulların sağlanması amacıyla alkol ile temizlendi.

3.6.3.RT-PCR Aşamaları

RNA tek zincir polinükleotid olup hidrolize olmaya DNA'ya göre çok daha yatkındır. RNA'yı hidrolize eden ribonükleazlar metal iyon kofaktöre ihtiyaç duymadıkları gibi, uzun süreli kaynatma veya otoklav sonrası bile aktiviteleri korunabilmektedir. Laboratuvar şartlarında RNA'dan revers transkriptaz (RTase) ile cDNA sentezlerken eldeki RNA'ların RTase ile degrade olmamaları için homojenizasyon aşamasında proteinaz K ilavesi ile RNase denatüre edilmiş olsa bile homojenizatta bulunan ve ortamdan bulaşabilecek ribonükleazların inhibisyonu amacıyla ribonükleaz inhibitörü kullanılmaktadır.

Çalışmalar, enzimatik aktivitenin minimal olması amacıyla kar üzerinde yapıldı.

1. Aşağıdakiler sırasıyla PCR tüpüne konuldu ve pipetajla karıştırıldı.

- Konsantrasyonu spektrofotometrede ölçülmüş olan örnekten 2000 ng total RNA (Örn: Konsantrasyonu 400 ng/µl olan örnekten 2000/400=5 µl)
- 1 µl random hexamer primer
- Karışım toplamını 12 µl'ye tamamlayacak kadar nükleazdan arındırılmış su (Örn: 5 µl total RNA ve 1 µl random hexamer primer kullanıldığında 6 µl nükleazdan arındırılmış su)

Oluşan köpüklerin giderilmesi ve sıvıların tüp dibinde toplanması amacıyla 3-5 saniye santrifüj edildi.

2. Karışım PCR cihazında +70°C'de 5 dakika inkübe edildi.
3. PCR tüpü kar üzerindeki bloklara yerleştirilip sırasıyla aşağıdakiler eklendi:

- 4 µl 5X reaksiyon tamponu
- 1 µl Ribonükleaz inhibitörü
- 2 µl 10 mM'lik dNTP karışımı

Oluşan köpüklerin giderilmesi için ve tüp içindeki sıvının tüp dibinde toplanması amacıyla 3-5 saniye santrifüj edildi.

4. Karışım PCR cihazında +25°C'de 5 dakika inkübe edildi.

5. Tüpler PCR cihazından çıkarılmadan 1 µl revers transkriptaz eklenerek karışım hacmi 20 µl'ye tamamlandı.

6. Karışım 10 dakika +25°C'de takiben +42°C'de inkübe edildi. 10 dakika +72°C'de tutularak reaksiyon sonlandırıldı.

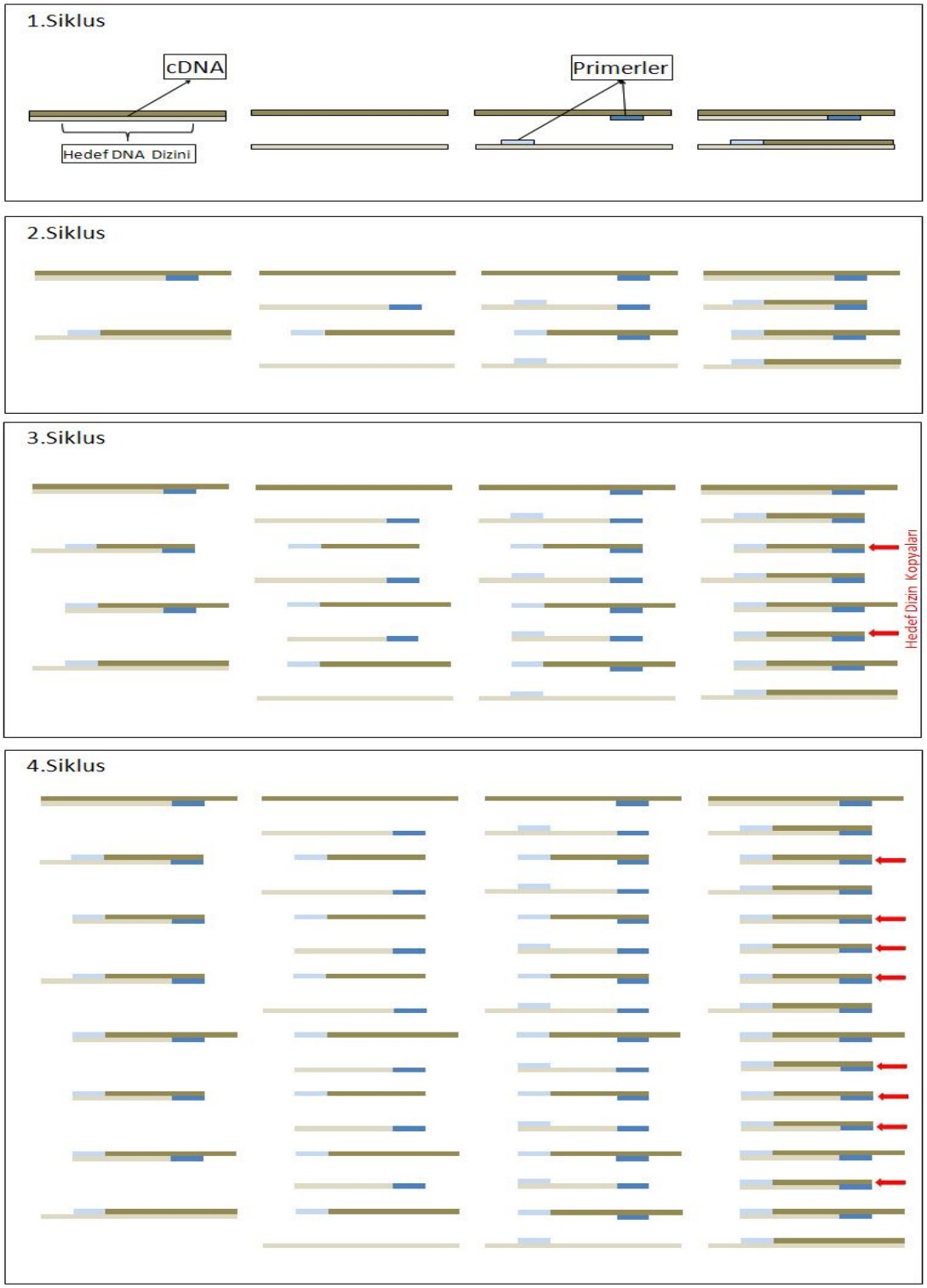
7. Karışım PCR'de +4°C'ye kadar kontrollü şekilde soğutulduktan sonra elde edilen yaklaşık 20 µl cDNA ileri basamaklarda kullanılıncaya kadar derin dondurucuda (-20°C) saklandı.

3.7.PLB, CaMKII, GAPDH Polimeraz Zincir Reaksiyonları

PCR ile nükleotid dizinleri tamamen bilinen DNA moleküllerinin in vitro koşullarda gerçekleştirilen reaksiyonlar ile çoğaltılması (amplifikasyonu) sağlanmaktadır. Büyük moleküllerde molekülün tamamının sentezlenmesi yerine molekülün belli kısımları çoğaltılabilir. cDNA'daki özgün bir bölgenin çoğaltılması için bu bölgedeki nükleotid dizinlerinin bilinmesi gerekir. Bu nükleotid bölgesine özgün kopyalama işlemine öncülük edip başlatacak primerler gereklidir. Primerler genellikle kimyasal olarak sentezlenen 15-20 bazlık sadece araştırılacak DNA'da eşleniği olan DNA oligonükleotid dizileridir. Tamamlayıcı DNA ipliklerinden karşıt yönlerde DNA sentezi başlatabilmesi için ikişer adet (forward ve reverse) PLB, CaMKII, GAPDH primerleri kullanıldı. Kalıp DNA'nın iki ipliğini ayırabilmek için yüksek sıcaklığa (+94°C) çıkarılarak reaksiyon başlatılır. Primerlerin DNA zinciri üzerinde kendilerine karşılık gelen diziler ile eşleşmeleri için sıcaklık düşürülür. Bu çalışmada PLB ve CaMKII için sıcaklık +55°C; GAPDH için +60°C olacak şekilde ayarlanmıştır. Ortama eklenen yüksek sıcaklığa dayanıklı polimeraz enzimi (Taq DNA polimeraz), primerleri kullanarak her iki iplikteki kalıba tamamlayıcı yeni bir iplik sentezini başlatır (Şekil 3.3). Çoklu ısıtma soğutma döngüleri ile 3. siklusta bu iki primer arasındaki dizinden 2 kopya, 30 siklus sonrası ise 2^{30} (yaklaşık 1 milyar) kopya edilir.

Kopya sayısı=$2^{\text{siklus sayısı}}$–2xsiklus sayısı

formülü ile hesaplanabilir.



Şekil 3.3. PCR Siklusları (272)

PCR'de kullanılan primer dizinler ile çoğaltılan hedef DNA dizini nükleotid sayıları Tablo 3.2'de yer almaktadır.

Tablo 3.2. PLB, CAMKII, GAPDH İçin Primer Dizinler, Hedef DNA Dizini ve Nükleotid Sayısı

Hedef DNA	Primer dizinleri	Hedef DNA dizini nükleotid sayısı
PLB	Forward: 5' TAC CTT ACT CGC TCG GCT ATC 3' Reverse: 5' CAG AAG CAT CAC AAT GAT GCA G 3'	141
CaMKII	Forward: 5' TCA GAT GTT TTG CCA CAA AGA GGT GCC TCC T 3' Reverse: 5' CCG GAT GGG GTA AAG GAG TCA ACT GAG AGC T 3'	531
GAPDH	Forward: 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3' Reverse: 5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3'	452

3.7.1.PCR İçin Kullanılacak Gereç ve Kimyasallar:

1. Sıcaklık döngüleyici (PCR cihazı, Thermocycler, Techne TC-412)

2. Soğutmalı mikrosantrifüj (Hettich Mikro 200R)

3. 0,1-2 µl, 2-20 µl ve 10-100 µl kapasiteli otomatik mikropipetler

4. Steril, ribonükleazdan arındırılmış pipet uçları

5. 200 µl kapasiteli steril, ribonükleazdan arındırılmış PCR tüpleri

6. Tek kullanımlık laboratuvar eldiveni

7. Kar makinesi (Ziegra ZBE30-10)

8. PCR tüplerinin üzerine konulup çalışacağı bloklar

9. Uygun primerler (273, 274, EK 2-4)

10. Taq DNA Polimeraz (Taq DNA Polymerase, 5 u/µl, 500 u, EP0402, Fermentas)
Kit içeriğinin ayrıntısı şu şekildedir:

a) Taq DNA polimeraz (5 u/µl, 500 u)
b) 10X Taq tamponu (1,25 ml)
c) 25 mM $MgCl_2$

Kit üreticiden temin edildikten sonra derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edildi.

11. dNTP Seti (100 mM dGTP, dATP, dTTP, dCTP, Fermentas)

12. Steril, ribonükleazdan arındırılmış su

3.7.2.Ön Hazırlık Aşaması

1. Soğutmalı mikrosantrifüj +4°C'ye ayarlandı.

2. Çalışma yapılacak alan steril koşulların sağlanması amacıyla alkol ile temizlendi.

3. Tüm solüsyonlar derin dondurucudan çıkarıldı ve solüsyonların buz üzerinde erimesi sağlandı.

4. Tüm solüsyonları içeren tüpler içlerine bulaşan sıvıların tüp dibinde toplanması amacıyla 3-5 saniye santrifüj edildi.

5. 100 mM dNTP setten, 10 mM dNTP karışımı hazırlandı.

6. Liyofilize primerler; son konsantrasyon GAPDH için 25 pmol/µl, CaMKII ve PLB için 50 pmol/µl olacak şekilde steril, ribonükleazdan arındırılmış su ile çözüldü.

3.7.3.PCR Aşamaları

PCR aşamaları Şekil 3.4'de gösterilen PCR cihazı (Thermocycler, Techne TC-412) ile yapılmıştır.



Şekil 3.4. PCR Cihazı (Thermocycler, Techne TC-412)

Çalışmalar enzimatik aktivitenin minimal olması amacıyla kar üzerinde yapıldı.

3.7.3.1.PLB PCR Protokolü:

1. Aşağıdakiler sırasıyla PCR tüpüne konuldu ve pipetajla karıştırıldı.

- 35 µl steril, ribonükleazdan arındırılmış su
- 3 µl 10X Taq tamponu
- 2 µl 10 mM'lik dNTP karışımı
- 1+1 µl (Forward + Reverse) primerler (50 pmol)
- 4 µl 25 mM'lik $MgCl_2$

- 3 µl RT-PCR ürünü (cDNA)

- 1 µl Taq DNA polimeraz

Oluşan köpüklerin giderilmesi ve sıvıların tüp dibinde toplanması amacıyla 3-5 saniye santrifüj edildi.

2. Karışım PCR cihazında +94°C'de 5 dakika inkübe edildi. Takiben 24 siklus boyunca; +94°C'de 30 saniye, +55°C'de 1 dakika, +72°C'de 1 dakika inkübe edildi. 10 dakika +72°C'de tutularak reaksiyon sonlandırıldı.

3. Karışım PCR cihazında +4°C'ye kadar kontrollü şekilde soğutulduktan sonra elde edilen yaklaşık 50 µl DNA yatay jel elektroforezi yapılıncaya kadar derin dondurucuda (-20°C) saklandı.

3.7.3.2.CaMKII PCR Protokolü:

1. Aşağıdakiler sırasıyla PCR tüpüne konuldu ve pipetajla karıştırıldı.

- 34 µl steril, ribonükleazdan arındırılmış su

- 4 µl 10X Taq tamponu

- 2 µl 10 mM'lik dNTP karışımı

- 1+1 µl (Forward + Reverse) primerler (50 pmol)

- 4 µl 25 mM'lik $MgCl_2$

- 3 µl RT-PCR ürünü (cDNA)

- 1 µl Taq DNA polimeraz

Oluşan köpüklerin giderilmesi ve sıvıların tüp dibinde toplanması amacıyla 3-5 saniye santrifüj edildi.

2. Karışım PCR cihazında +94°C'de 3 dakika inkübe edildi. Takiben 35 siklus boyunca; +94°C'de 30 saniye, +55°C'de 1 dakika, +72°C'de 1 dakika inkübe edildi. 7 dakika +72°C'de tutularak reaksiyon sonlandırıldı.

3. Karışım PCR cihazında +4°C'ye kadar kontrollü şekilde soğutulduktan sonra elde edilen yaklaşık 50 µl DNA yatay jel elektroforezi yapılıncaya kadar derin dondurucuda (-20°C) saklandı.

3.7.3.3.GAPDH PCR Protokolü

1. Aşağıdakiler sırasıyla PCR tüpüne konuldu ve pipetajla karıştırıldı.

- 34 µl steril, ribonükleazdan arındırılmış su
- 4 µl 10X Taq tamponu
- 2 µl 10 mM'lik dNTP karışımı
- 2+2 µl (Forward + Reverse) primerler (25 pmol)
- 4 µl 25 mM'lik $MgCl_2$
- 3 µl RT-PCR ürünü (cDNA)
- 0,6 µl Taq DNA polimeraz

Oluşan köpüklerin giderilmesi ve sıvıların tüp dibinde toplanması amacıyla 3-5 saniye santrifüj edildi.

2. Karışım PCR cihazında +94°C'de 3 dakika inkübe edildi. Takiben 30 siklus boyunca; +94°C'de 30 saniye, +60°C'de 30 saniye, +72°C'de 1 dakika inkübe edildi. 5 dakika +72°C'de tutularak reaksiyon sonlandırıldı.

3. Karışım PCR cihazında +4°C'ye kadar kontrollü şekilde soğutulduktan sonra elde edilen yaklaşık 50 µl DNA yatay jel elektroforezi yapılıncaya kadar derin dondurucuda (-20°C) saklandı.

3.8.PLB, CaMKII, GAPDH Ürünlerinin Jel Elektroforezi ve Görüntülenmesi

3.8.1.Jel Elektroforezi İçin Kullanılacak Gereç ve Kimyasallar:

1. Yatay elektroforez jel sistemi (Minicell Primo Model, EC320, Thermo)

2. Güç kaynağı (EC250-90, Mid-Range Power Supply, Thermo)

3. 2-20 µl kapasiteli otomatik mikropipetler

4. Steril, ribonükleazdan arındırılmış pipet uçları

5. Tek kullanımlık laboratuvar eldiveni

6. Parafilm

7. Beher (50 ve 500 ml)

8. Mezür

9. 1X TBE çözeltisi (89 mM Triborikasit, 2 mM disodium EDTA, tris asit DNA'yı deprotonize eder ve suda çözünmüş halde kalmasını sağlarken, EDTA Mg için şelatör olup Mg'nin kofaktör olduğu enzimleri inhibe ederek DNA'nın enzimatik degradasyonunu engeller)

10. % 5'lik etidium bromür çözeltisi (Floresan özellikte olup agaroz jel içindeki DNA'yı görünür hale getirmek için kullanılır)

11. 6X yükleme boya solüsyonu (Fermentas, R0611)

12. Agar (Prona Agarose)

13. Manyetik balık

14. Isıtıcılı magnetik karıştırıcı (Isotex, SH-4)

3.8.2.Jel Elektroforezi Aşamaları

PCR ürünlerinin görüntülenip ölçülebilmesi amacıyla moleküllerin elektrik akımı altında göç etme hızlarına göre ayrılmalarını temel alan jel elektroforezi tekniği kullanıldı.

Jel elektroforezinin yapılacağı tanka 1X TBE solüsyonu konulup 10 µl etidium bromür çözeltisi eklendi.

% 2'lik agaroz jel hazırlamak için:

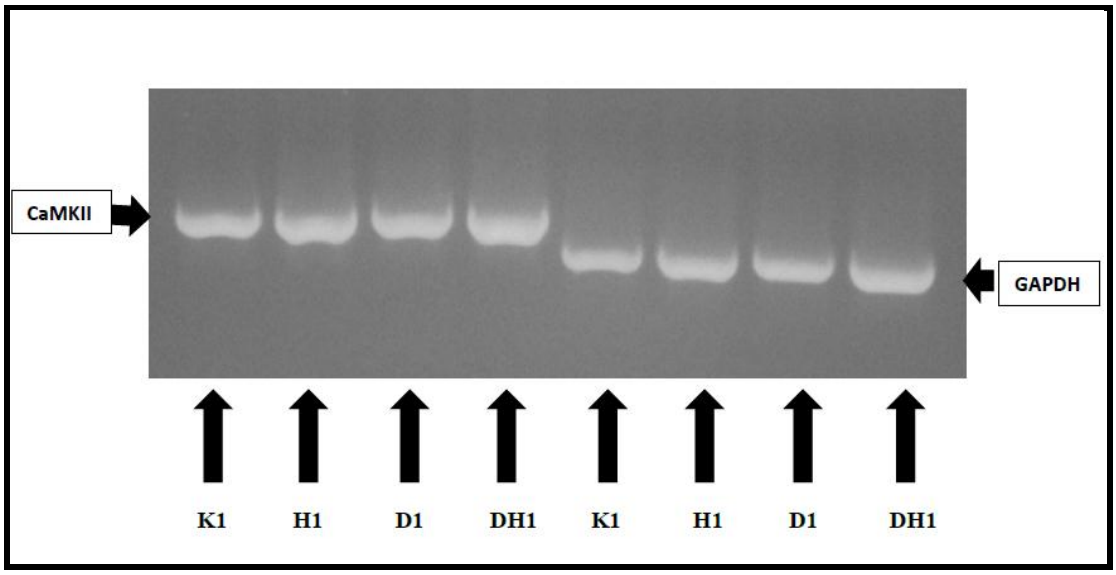
1. Isıtıcılı manyetik karıştırıcı 250 rpm ve 300°C'ye ayarlandı. Üzerine 500 ml'lik beher yerleştirilip içine 50 ml'lik beherin boyunun yarısına denk gelecek kadar su konuldu.
2. 50 ml'lik beher içine 600 mg agar konuldu. 1X TBE ile 30 ml'ye tamamlandı. Karıştırma için içine manyetik balık konuldu. Beherin ağzı parafilm ile kapatılıp 500 ml'lik beherin içine konuldu.
3. 500 ml'lik beher içindeki suyun kaynaması ile agarın erimesi gözlendi. Agarın kaynamaya başlaması ile agar içeren beher çıkarıldı. Agar içine 1,5 µl % 5'lik etidium bromür eklendi.
4. Jel tabakasının içine etidium bromürlü agar jeli döküldü, kuyuların oluşması için sekizli tarak kullanıldı. Jelin donması beklendi.
5. Jel donduktan sonra tarak çıkarıldı, jel tablası tank içine yerleştirildi.
6. PLB, CaMKII ve GAPDH PCR ürünlerinden 15 µl ve 6X yükleme boyasından 3 µl pipetajla karıştırılıp jeldeki kuyulara yüklendiler. Bir jelde aynı doku grubunun birer K, AH, DM ve DM+AH deney hayvanına ait PCR ürünleri ve bunların kontrolü olan GAPDH PCR ürünü yüklendi.
7. PLB ürünleri jelde 60 dakika; CaMKII ürünleri ise 75 dakika süresince 100 voltluk akımda yürütüldüler. Yürütülme sonrası 15 dakika içinde görüntülendiler.

3.8.3.Agaroz Jel Görüntülenmesi ve Ölçümleri

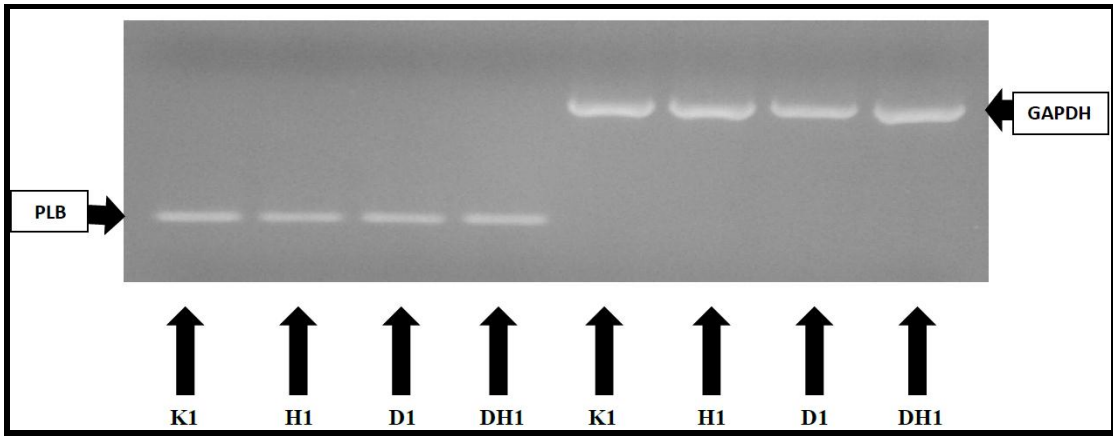
Elektroforez sonrası agaroz jel görüntülenmesi Şekil 3.5'de gösterilen UV kamera (Cleaver Scientific, DI-HD) kullanılarak elde edildi. CaMKII, PLB ve GAPDH agaroz jel görüntüleri Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.5. UV Kamera (Cleaver Scientific, DI-HD)



Şekil 3.6. CaMKII, GAPDH Agaroz Jel Görüntüleri



Şekil 3.7. PLB, GAPDH Agaroz Jel Görüntüleri

Elde edilen görüntülerde bant yoğunlukları "National Institutes of Health" sitesinden serbest olarak indirilip kullanılabilen Image J analiz programı kullanılarak yapılmıştır (275).

K, AH, DM ve DM+AH gruplarındaki LV PLB ve CaMKII mRNA bant yoğunlukları, deney protokolünde seviyesi değişmeyen (house keeping) GAPDH

mRNA bant yoğunluklarına oranlanarak PLB/GAPDH ve CaMKII/GAPDH değerleri elde edilmiştir.

3.9.İstatistiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirmelerde tüm gruplarda denek sayısı 15'ten az olduğu için grup karşılaştırmalarında nonparametrik test olan Kruskal Wallis testi kullanıldı. Kruskal Wallis testi sonucu bulunan p değeri anlamlı bulunduğunda, farklılığı yaratan grupların tespit edilmesi amacıyla çoklu karşılaştırma (multiple comparisons) testleri uygulandı (276). Her bir grup için kan glukozu ve ağırlık açısından deney başlangıcındaki ve sonundaki ölçüm değerleri Wilcoxon testi ile karşılaştırıldı. İstatistiksel analizler SPSS 15.0 programı ile gerçekleştirildi. $P<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Değerler ortalama ± standart sapma ($\overline{X}$±SS) olarak verildi.

4.BULGULAR

4.1.Deney Hayvanlarının Deney Başlangıcı ve Sonundaki Ağırlık Sonuçları

Deneylere başlangıç ağırlıkları açısından dört grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,056, Tablo 4.1).

Deney sonu ağırlıkları açısından DM ile AH grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,007, Tablo 4.1, Şekil 4.2).

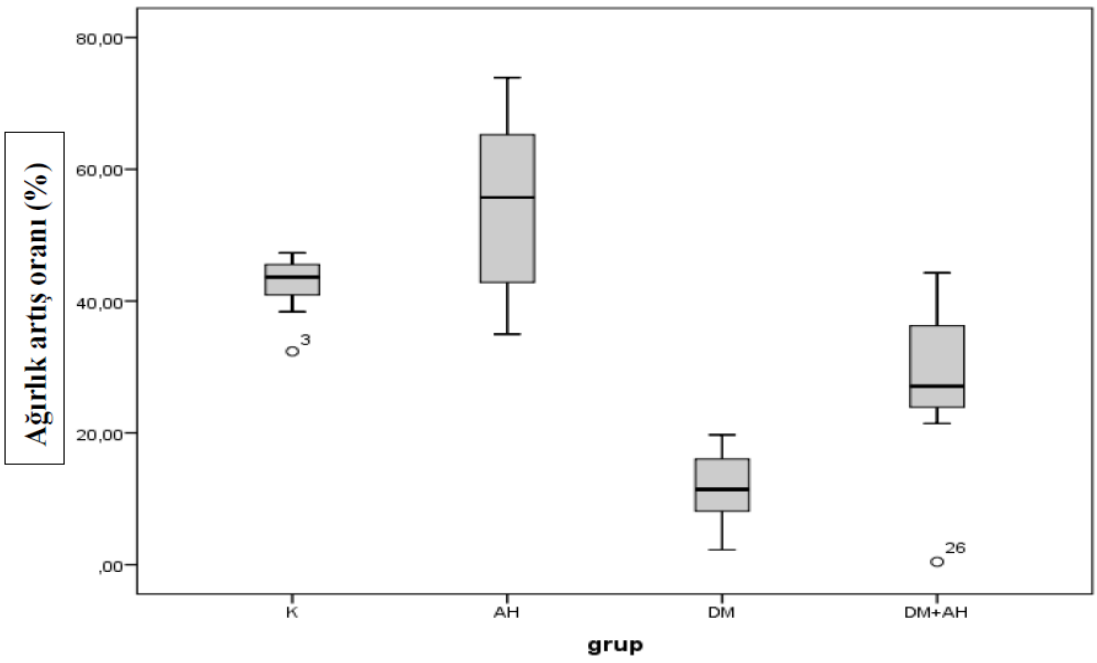
Tablo 4.1. Deney Hayvanlarının Deney Başlangıcı ve Deney Sonundaki Ağırlık Değerleri ve Ağırlık Artış Oranları

Grup	Başlangıç Ağırlıkları ($\bar{X}$±SS)	Son Ağırlıkları ($\bar{X}$±SS)	Ağırlık Artış Oranı (%)
K	209,71±11,01	298,43±18,42	43,64
AH	210,11±16,27	327±49,11	55,72
DM	232,25±19,41	259±22,35$^{\#}$	27,09$^{*\#}$
DM+AH	219,20±17,75	279±27,53	35,61$^{\#}$

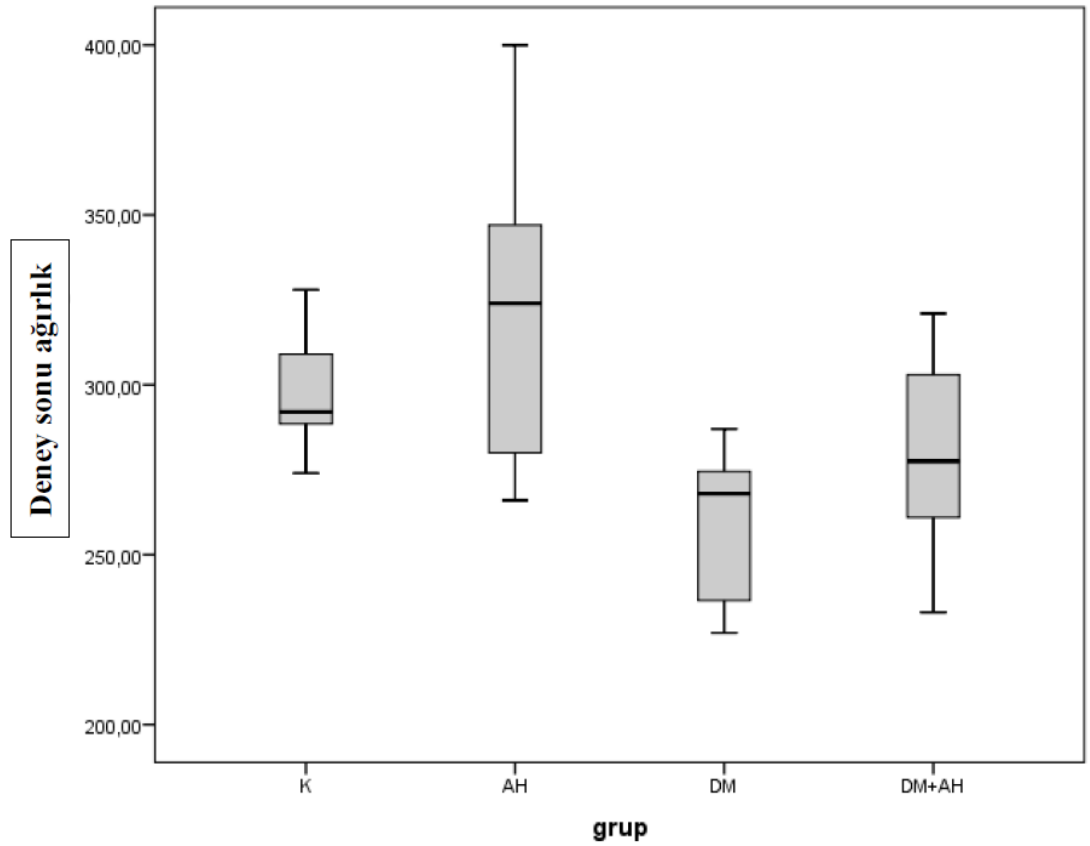
*K grubu ile anlamlı fark (p<0,05)

$^{\#}$AH grubu ile anlamlı fark (p<0,05)

Deney hayvanlarının ağırlık artış oranları incelendiğinde; AH grubunda ağırlık artışının en fazla, DM grubunda en az olduğu gözlendi ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 4.1, Şekil 4.1, p<0,05).



Şekil 4.1. Deney Hayvanlarının Deney Başlangıcı ve Sonundaki Ağırlık Artış Oranları



Şekil 4.2. Deney Hayvanlarının Deney Sonu Ağırlık Ortalamaları

4.2.Deney Hayvanlarının Deney Başlangıcı ve Sonundaki Kan Glukoz Sonuçları

Deneylerin başlangıcında kan glukoz düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,618).

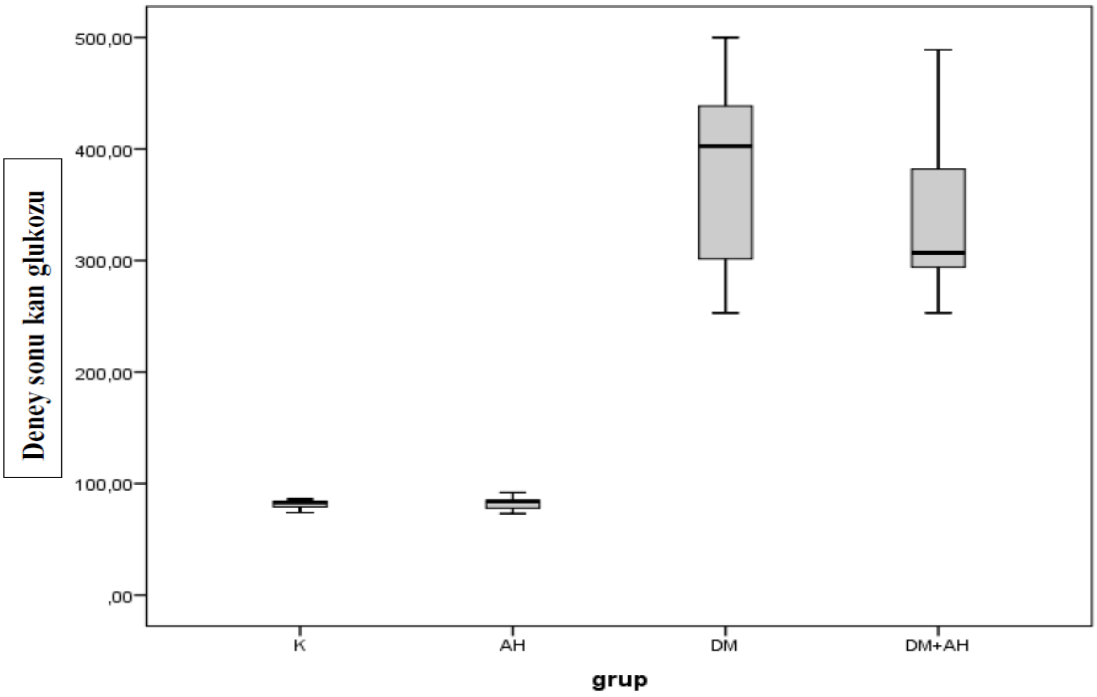
Deney sonunda kan glukoz düzeyleri açısından K ile DM (p=0,003), K ile DM+AH (p=0,024), AH ile DM (p=0,001), AH ile DM+AH (p=0,006) grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4.3).

Tablo 4.2. Deney Hayvanlarının Deney Başlangıcı ve Sonundaki Kan Glukoz Düzeyleri ve Artış Oranları

Grup	Başlangıç Kan Glukoz Düzeyleri ($\bar{X}$±SS)	Son Kan Glukoz Düzeyleri ($\bar{X}$±SS)	Kan Glukoz Düzeyleri Artış Oranı ($\bar{X}$±SS)
K	95,40±16,13	81,20±4,76	-9,47
AH	92,22±13,54	82,33±6,75	-12,79
DM	96,63±17,32	379,75±86,28*#	329,62*#
DM+AH	103,90±16,66	328,30±71,78*#	217,15*#

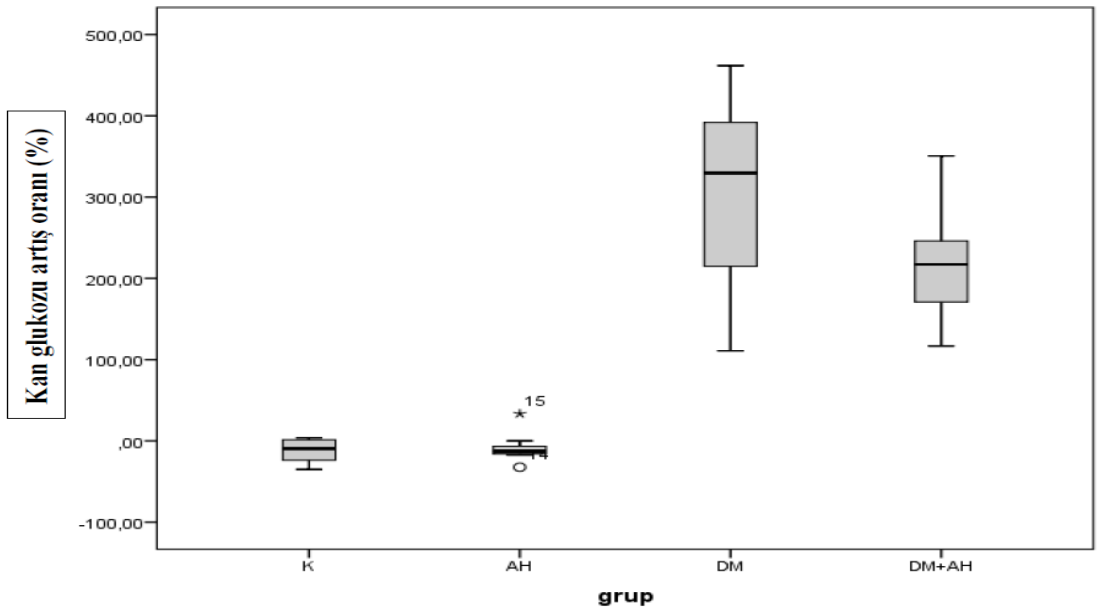
*K grubu ile anlamlı fark (p<0,05)

#AH grubu ile anlamlı fark (p<0,05)



Şekil 4.3. Deney Hayvanlarının Deney Sonu Kan Glukoz Düzeyleri

K ile DM+AH; K ile DM; AH ile DM ve AH ile DM+AH grupları arasında kan glukoz düzeyleri artışı oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Şekil 4.4, Tablo 4.2).



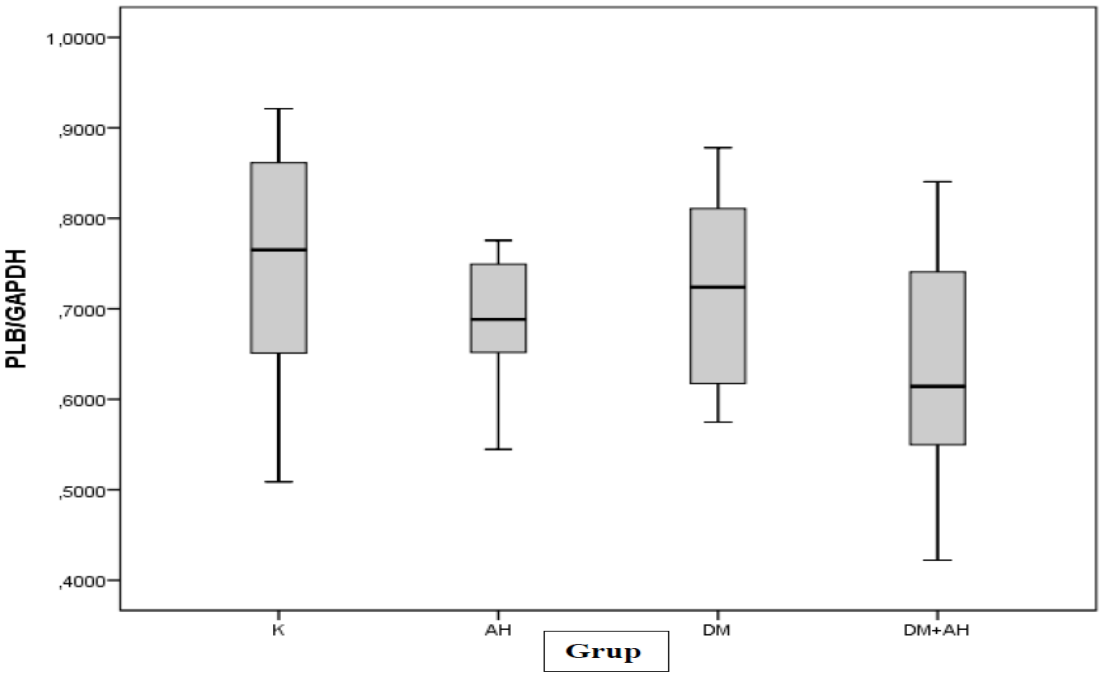
Şekil 4.4. Deney Hayvanlarının Deney Başlangıcı ve Sonundaki Kan Glukoz Düzeyleri Arasındaki Artış Oranları

4.3.PLB Sonuçları

Gruplar arasında PLB/GAPDH açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p=0,294, Tablo 4.3, Şekil 4.5).

Tablo 4.3.PLB/GAPDH Sonuçları.

	K ($\overline{X}$±SS)	AH ($\overline{X}$±SS)	DM ($\overline{X}$±SS)	DM+AH ($\overline{X}$±SS)
PLB/GAPDH	0,75±0,15	0,68±0,08	0,72±0,11	0,63±0,13



Şekil 4.5. PLB/GAPDH Sonuçları.

4.4.CaMKII Sonuçları

CaMKII/GAPDH açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Tablo 4.4, Şekil 4.6, p<0,001).

Tablo 4.4.CaMKII/GAPDH Sonuçları

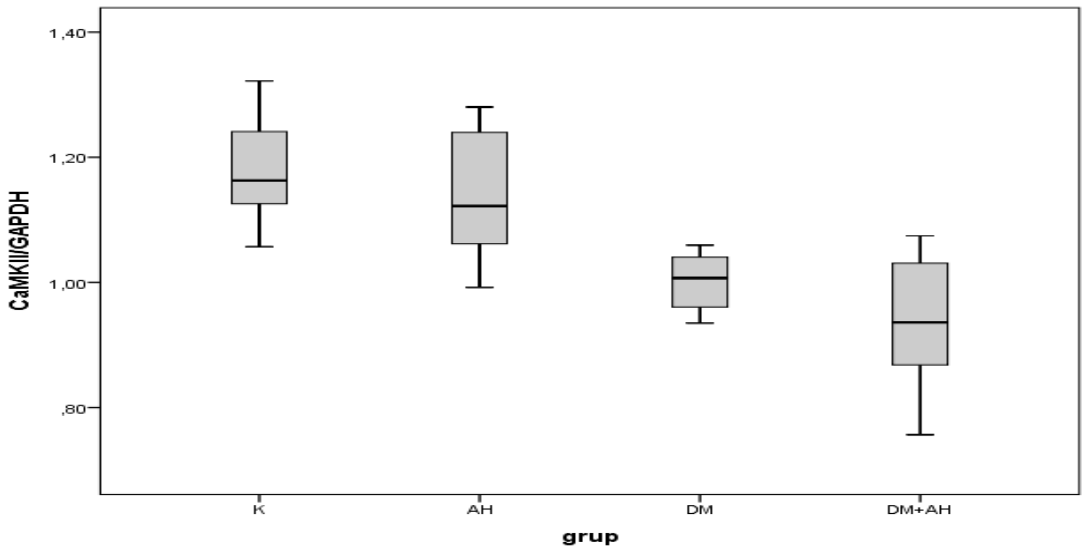
	K ($\overline{X}$±SS)	AH ($\overline{X}$±SS)	DM ($\overline{X}$±SS)	DM+AH ($\overline{X}$±SS)
CaMKII/GAPDH	1,18±0,92	1,14±0,10	1,00±0,05*	0,93±0,11*#

*K grubu ile anlamlı fark (p<0,05)

#AH grubu ile anlamlı fark (p<0,05)

Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında:

K ile DM; K ile DM+AH ve AH ile DM+AH grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Tablo 4.4).



Şekil 4.6. CaMKII/GAPDH Sonuçları

5.TARTIŞMA

Yapılan çalışmalar deney hayvanlarında STZ ile indüklenmiş diyabetik sıçanlarda 6 hafta sonra DKMP geliştiğini göstermiştir (7, 8, 9). Çalışmamızda deney hayvanlarının kalpleri STZ uygulamasından 7 hafta sonra alınmıştır. Bu süre DKMP gelişimi için yeterli olarak kabul edilmiştir.

STZ ile indüklenen DKMP'de AH uygulaması ile PLB mRNA düzeyinde değişiklik gözlenmezken CaMKII mRNA düzeylerinin azaldığı saptandı. Bu bulgular hipotezimizi desteklememiştir. Çalışmamızda sadece PLB ve CaMKII mRNA düzeylerinin saptanmış olması, bu moleküllerin protein düzeyleri ile LV fonksiyon parametrelerinin değerlendirilmemiş olması önemli kısıtlayıcı faktörlerdir. Ayrıca sitozolik Ca^{+2}'nin uzaklaştırılmasında temel proteinlerden biri olan SERCA'nın mRNA ve protein düzeylerinin ve SERCA'nın aktivitesinden sorumlu PLB'nin fosforile formunun gösterilmemiş olması da önemli kısıtlılıklar olarak sayılabilir.

Anabilim Dalımızda yapılan deneysel bir çalışmada STZ ile indüklenen Tip 1 DM'ye bağlı sol ventrikül diyastolik fonksiyon bozukluğunda AH'nin DM gruplarında iyileşmeye aracılık ettiği bulunmuştur (25). DKMP'de, AH uygulaması ile diyastolik disfonksiyondaki bu düzelme, AH'nin Ca^{+2} homeostazisi ile ilişkili proteinler üzerinde etkili olduğunu düşündürmüştür.

DKMP oluşumuna neden olan mekanizmalardan biri; Ca^{+2} homeostazisindeki bozulmadır. Diyabetik kalplerde yapılan çalışmalar birbiriyle çelişen sonuçlar içermektedir. Bazı çalışmalar PLB mRNA ve protein seviyelerinin arttığını (10, 11) gösterirken, başka çalışmalar PLB protein seviyelerinin özellikle aktif form olan fosforile PLB miktarının azaldığını (12-14) göstermektedir. PLB'nin fosforillenmesini sağlayan temel proteinlerden CaMKII aktivitesinin diyabetik kalplerde arttığını bildiren çalışmalar mevcuttur (12, 13, 15). CaMKII aktivitesindeki artışa rağmen PLB'nin fosforilasyonunda azalma gösterilmiştir. Bu azalmanın PLB'nin fosforilasyonunu azaltan protein fosfatazdaki artışa veya PLB proteinindeki

azalışa bağlı olabileceği önerilmiştir (12, 13). Ekspresyonu azalmış olan SERCA'nın PLB fosforilasyonunda azalmaya bağlı olarak aktivasyonunda da azalma olmaktadır (16, 17). Diğer taraftan, ROS aracılı CaMKII aktivasyonunun yeni bir formu da tarif edilmiştir. DM'de ROS'de artış olduğu iyi bilinmektedir (277). ROS aracılığıyla oluşan CaMKII, okside CaMKII olarak tanımlanmıştır. Okside CaMKII'nin arttığı ve aracılığıyla PLB fosforilasyonun da arttığı gösterilmiştir (163, 164, 278). Çalışmamızda CaMKII, okside CaMKII düzeyleri belirlenmediği gibi ROS'nin etkileriyle ilgili parametrelere de bakılmamıştır. CaMKII mRNA düzeylerindeki azalmalar, negatif geribildirim ile veya başka mekanizmalarla okside CaMKII ya da ROS artışından kaynaklanmış olabilir.

Yapılan bir çalışmada kronik AH uygulamasının ventrikül miyositlerinde I/R hasarına karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir (279). 7 gün kronik AH uygulanmış sıçan ventrikül miyositlerinde infarkt alanının ve LDH düzeyinin normoksik gruptakilere göre daha az, Ca^{+2} taşınması ile ilgili parametrelerin daha iyi olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada SERCA, NCX, RyR protein düzeyleri de ölçülmüş, önemli bir değişiklik bulunmamıştır. Buna karşın Na^{+}-Ca^{+2} değişim oranının ve RyR tarafından Ca^{+2} salgılanmasının hipoksik grupta önemli düzeyde yüksek olduğu, PKA ve PKC inhibitörleri ile bu etkilerin ortadan kaldırıldığı gözlenmiştir. PKA ve PKC'nin fosforilasyonu ile sırasıyla RyR ve NCX aktivitelerinin arttırılmasının kronik AH'nin indüklediği kalbi koruyucu etkisinde önemli rolü olduğu ileri sürülmüştür. Bu bulgular ve çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar birlikte yorumlandığında; AH uygulaması sonucu Ca^{+2}'nin hücre içinden uzaklaştırılmasında SERCA'dan ziyade PKC artışı aracılı NCX aktivitesi artması sorumlu olabilir. Yükselmiş PKA sonucu RyR aktivitesinin de artması beklenir. CaMKII seviyesinde azalma varsa, bu durum PKA ve PKC gibi kinazlardaki artış ile dengelenmiş olabilir.

SERCA geninin promotor bölgesinde birden fazla hipoksi yanıt elemanı (HRE) bölgesi olduğu, indüklenen HIF'nin SERCA'nın stimülasyonunu sağladığı gösterilmiştir (280). AH'nin I/R sırasında azalmış SERCA2 aktivitesi ve fonksiyonlarını dengeleyerek Ca^{+2} homeostazisini sağladığı bildirilmiştir (266). Bu veriler ışığında sonuçlarımız değerlendirildiğinde; AH uygulaması ile HIF-1α transkripsiyonel aktivitesinin artışı, HRE bölgesi içeren SERCA'nın stimülasyonunu

arttırarak SR içine Ca^{+2} alınmasını gerçekleştirmiş, hücre içi Ca^{+2} dengesi sağlandığından PLB mRNA düzeyi değişmemiş olabilir.

Yuan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada kültür hücreleri 4 dakika % 20'lik (normoksik) ve takiben 30 saniye % 1,5'lik O_2'ye 60 siklus boyunca maruz bırakılarak AH uygulanmıştır (281). AH uygulanan hücrelerde aktivitesi 5 kat artan CaMKII'nin HIF-1α p300'ü fosforile ettiği (281, 282); CaMKII inhibitörü olan KN93'ün, AH'nin indüklediği HIF-1α transaktivasyonunu engellediği gösterilmiştir (281). Bu sonuçlar, AH'nin CaMKII'yi de içeren yeni bir sinyal yolağıyla HIF-1α transkripsiyonel aktivitesini indüklediğini düşündürmektedir. Ancak çalışmamızda CaMKII mRNA düzeyinin DM ve DM+AH gruplarında azalmış olması uygulamış olduğumuz AH sonucunda CaMKII'den bağımsız olarak HIF-1α transkripsiyonel aktivitesinin artışı SERCA'nın stimülasyonunu arttırarak SR içine Ca^{+2} alınmasını gerçekleştirmiş olabilir.

I/R'nin indüklediği kardiyak disfonksiyonda AH uygulamasının CaMKII aktivitesi yanında PLB fosforilasyonunu da arttırdığı gözlenmiştir (27). I/R kalp modellerinde SR'ye Ca^{+2} pompalama aktivitesinin azaldığı, AH uygulanan kalplerde ise bu azalmanın önlendiği gösterilmiştir (26). Bu sonuçlar I/R modelinde AH'nin kalbi koruyucu etkisine CaMKII'nin PLB'yi fosforile ederek aracılık ettiğini düşündürmektedir. Çalışmamızda CaMKII mRNA düzeylerini 6 hafta AH uygulaması sonucunda değerlendirdik. AH uygulamasının ilk haftalarında değerlendirmediğimiz ancak olası CaMKII artışı ile PLB aktivitesi artmış olabilir. İlerleyen süreçte ise SERCA artışının negatif geribildirim mekanizması ile CaMKII ve PLB'de aşağı düzenleme gerçekleşmiş olabilir.

RyR ve SERCA2 aktivitelerinin ve/veya protein içeriklerinin I/R sırasında azaldığı ve AH ile bu değişikliklerin büyük oranda düzeldiği bildirilmiştir (268, 283-285). Yapılan başka çalışmalarda (27, 269) PLB'nin azalmış fosforilasyonunun SERCA2 aktivitesini azalttığı ve diyastolik disfonksiyona sebep olduğu gösterilmiştir. AH uygulaması ile artan PKA ve CaMKII tarafından indüklenen PLB fosforilasyonu (sırasıyla Ser^{16} ve Thr^{17} bölgelerinden), artmış SR Ca^{+2} geri alınmasına neden

olmuştur (27). Diğer bir çalışmada sıçan miyokardında I/R tarafından indüklenen APS kısalmasının, AH tarafından iyileştirilebileceği gözlenmiştir (286). APS SR'ye Ca^{+2} taşınmasını etkileyebildiğinden (287); bu elektrofizyolojik değişiklik, AH uygulaması ile SR Ca^{+2} geri alınmasının arttırılmasına katkıda bulunabilir. I/R sırasında azalmış SR Ca^{+2} geri alınmasıyla tutarlı olarak, RyR'lerden sitoplazmaya Ca^{+2} salgılanması reperfüzyon sonunda azalmıştır. RyR, SR'deki Ca^{+2} aşırı yükünü hafifletebilmesine karşın (268, 288), azalmış aktiviteleri, SR'den Ca^{+2} salgılanmasında azalmaya neden olacağından kontraktiliteye zarar verecektir. Bu görüş, AH ile RyR'lerin korunmuş aktivitesinin, sitoplazmaya Ca^{+2} geçiş amplitüdünde ve hücre kısalmasındaki artış arasında korelasyon olduğunu gösteren bir çalışma ile desteklenmiştir (289). AH grubunda I/R'nin neden olduğu SR Ca^{+2} yükü hafiflemiştir. Bu veriler AH'nin, sitozolik Ca^{+2} aşırı artışını RyR'lerin ve SERCA2'lerin protein içeriklerini ve fonksiyonlarını koruyarak baskılayabileceğine işaret etmektedir.

I/R uygulamasının sıçan kalbinde, CaMKII aktivitesi, fosforillenmiş PLB (Thr^{17} bölgesi) ve Ca^{+2}-kalmodulin bağımlı SR'ye Ca^{+2} pompalanmasını azalttığı, AH uygulamasının bu değişimleri engellediği gösterilmiştir. I/R uygulanan gruplarda etkinin sitozolik CaMKII ve SR PP1 aktivitelerindeki azalma ile gerçekleştiği, AH uygulanan grupta bu proteinlerin aktivitelerinde azalma olmadığı rapor edilmiştir (26). Çalışmamızda AH uygulanan DM grubunda PKC aracılığıyla PP1 artışı, PLB'yi defosforile ederek azaltmış olabilir. Diğer taraftan hipoksi koşullarında β adrenerjik sistemin uyarılması ile PKA artışı indüklenip PP1 baskılanarak PLB fosforile edilmiş olabilir. PKA ve PKC'nin PLB üzerindeki etkileri zıt yönde olduğundan PLB düzeyinin değişmemiş olduğu yorumu yapılabilir. Yapılan bir çalışmada PKA inhibisyonu ile AH'nin kalpte artmış PLB'nin Ser^{16} fosforilasyonunu tamamen inhibe ettiğini düşündüren bulgular elde edilmiştir (27). Bu bulgu da AH'nin PKA üzerinden role sahip olabileceğini düşündürmektedir.

İskemi intraselüler asidoza neden olmaktadır (290). Asidozda, β adrenerjik agonist isoproterenol ile PLB'nin Ser^{16} fosforilasyonunda bir değişiklik olmazken, isoproterenol yokluğunda fosforilasyonun azaldığı gözlenmiştir (291). Ayrıca

asidozun, intraselüler Ca^{+2} düzeyini arttırarak (292) sıçan miyokardında PLB'yi defosforile eden temel fosfataz olan PP1'in aktivitesini inhibe ettiği de bildirilmiştir (293). DM gruplarımızda değerlendirilmemiş olmakla birlikte ketoasidoz gelişmiş olma olasılığı çok yüksektir. Ketoasidoz bir yandan PP1'in aktivitesini inhibe ederek PLB düzeyini arttırırken, diğer yandan PLB'nin Ser^{16} fosforilasyonunu azaltarak PLB düzeyini dengede tutmuş olabilir. Ayrıca ketoasidoz sonucu artan intraselüler Ca^{+2} düzeyi CaMKII düzeyini azaltmış olabilir.

DM'de enerji eldesinin bozulduğu bilinmektedir. Total fosfokreatin (PCr) havuzunun, yetmezlik gözlenen miyokardda % 60 azaldığı ve buna bağlı olarak PCr/ATP oranında da azalma olduğu gösterilmiştir (294). ATP seviyeleri önemli ölçüde düşmüş olmamasına karşın PCr miktarındaki azalma, miyofibriller çevresindeki ATP havuzlarını etkileyerek ATP üretim hızını sınırlayabilir. Glikoliz ile ATP sentezi, SR'ye Ca^{+2} taşınması için kullanıma hazır ATP kaynağı sağlamaktadır ve glikolizdeki azalma SERCA aktivasyonunu ve enzim kinetiğini etkileyebilir (295, 296). KY olan sıçanlarda adenoviral gen transferi ile arttırılmış PCr/ATP ve SERCA artışı arasında ilişkili bulunmuştur (112, 297). Bu bulgu, ECC'deki düzelmenin, artmış enerji eldesi ile geliştirildiği hipotezini desteklemektedir. Hipoksi uygulaması ile yağ asitlerine göre O_2'nin daha verimli kullanılmasını sağlayan karbonhidratların tercihi artmaktadır (298). Glukoz kullanımının arttırılması ATP üretimini % 12-14 arttırmaktadır (299). Yağ asidi düzeyindeki hafif yükselme % 33 daha fazla O_2 tüketimini sağlamaktadır (300). AH mitokondride NAD bağımlı metabolizmayı içeren değişiklikleri indükleyerek ATP üretiminde O_2 tüketiminin verimliliği arttırmaktadır (301). Glukozun daha fazla kullanılır hale gelmesi O_2'ye ihtiyacı azaltır ve iskemiye karşı daha fazla direnç sağlar. Hipoksi sonucu HIF ile indüklenen GLUT 1 seviyesi artarken (302), glukoz oksidasyonunu inhibe eden pirüvat dehidrogenaz kinaz 4 azalmaktadır (303). Bu etkiler beraberce glukoz kullanımını arttırmaktadır. Hipoksi uygulaması ile β-Hidroksi açil-KoA dehidrogenaz gibi yağ asidi oksidasyonunda görevli enzimlerin aktivitesi (304) ve yağ asidi ile ilgili metabolik genlerin düzenleyicisi olan PPAR-α'nın gen ekspresyonunun azaldığı (305) da gösterilmiştir. Bu bilgiler, AH'nin DM'de bozulmuş olan glukoz kullanımını arttırarak daha verimli enerji elde

edilmesine neden olmuş olabileceğini, hipoksiye bağlı metabolik adaptasyonların kardiyoprotektif etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

6.SONUÇLAR

Literatür verisi AH uygulaması sonucu kalp hücresindeki Ca^{+2} düzeylerinde Ca^{+2} homeostazisini sağlayan yolaklarda işlev gören protein düzeyi ve aktivasyonlarında ve kalp fonksiyonlarında anlamlı değişiklikler olduğunu göstermektedir. Anabilim Dalımızda STZ ile indüklenen DM'li hayvanlara AH uygulaması ile kalp fonksiyonlarında iyileşme gözlenmiş olmasına rağmen, çalışmamızda hipotezimiz olan PLB ve CaMKII mRNA düzeylerinde artış olmaması, CaMKII mRNA düzeylerinin DM'li gruplarda tersine azalmış olmasının olası sebepleri olarak aşağıdakiler sayılabilir:

1. AH uygulaması PLB ve CaMKII dışındaki yolaklar ile Ca^{+2} homeostazisi üzerinde etkilidir. Bu yolaklar:

- AH, HIF-1α transaktivasyonu aracılığıyla SERCA aktivitesini arttırıp SR'ye Ca^{+2} pompalanmasını sağlayabilir.

- DM'de bozulmuş glukoz kullanımının AH ile artması SERCA aktivasyonunu arttırmış olabilir.

- AH uygulaması SR'ye Ca^{+2} pompalanması için CaMKII'den ziyade PKC ve PKA gibi kinazları aktive etmiş olabilir.

- AH uygulaması sonucu artan NCX aktivitesi ile arttırılmış Ca^{+2} taşınması üzerinden kardiyoprotektif etki sağlanmış olabilir.

- AH, DM grubunda RyR ve SERCA2'deki azalışı engelleyerek Ca^{+2} homeostazisini sağlamış olabilir.

- Ketoasidoz bir yandan PP1'in aktivitesini inhibe ederek PLB düzeyini arttırırken, diğer yandan PLB'nin Ser^{16} fosforilasyonunu azaltarak PLB düzeyini dengede tutmuş olabilir.

- ROS artışı ve buna bağlı okside CaMKII seviyesindeki artış negatif geribildirim ve/veya başka mekanizmalarla CaMKII mRNA düzeylerinde azalmaya neden olmuş olabilir.

2. Uyguladığımız AH süresinin uzun olması nedeniyle PLB ve CaMKII mRNA aşağı düzenlenmesi gerçekleşmiş olabilir.

AH'nin hangi yolaklar aracılığıyla etki ettiği tam olarak bilinmemektedir. Yukarıda saydığımız olası yolakların daha ayrıntılı bir çalışmayla analizi gerekmektedir. Yaptığımız literatür taramalarında DM modelinde AH uygulaması ve Ca^{+2} homeostazisi ilişkisini inceleyen çalışmalara rastlanmamıştır. Bu yönüyle orjinal bir çalışma olup yapılacak diğer çalışmalara ışık tutacaktır. Bununla birlikte mRNA düzeylerindeki değişimler her zaman tek başına DM ve AH etkilerini açıklamayabilir. Translasyonel ve/veya posttranslasyonel düzeydeki etkiler ile protein düzeylerinde ve/veya aktivasyonlarında ortaya çıkabilecek değişimler de önemlidir. İleri çalışmalarda yukarıda sayılan moleküllerin mRNA düzeyleri yanında, protein düzeyleri ve fosforile formları değerlendirilmelidir ve kalp fonksiyonlarıyla ilgili parametrelerin de çalışmaya dahil edilmesi gereklidir. Anabilim dalımızdaki çalışmalar bu yönde devam etmektedir.

ÖZET

Deneysel Tip 1 Diabetes Mellitusta Kalp Kası Kalsiyum Homeostazisi Üzerine Aralıklı Hipoksinin Etkisi

Dünyadaki önemli sağlık problemlerinden biri olan diabetes mellitusa bağlı morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biri diyabetik kardiyomiyopatidir. Streptozotosin ile deneysel olarak Tip 1 diabetes mellitus oluşturulan sıçanlarda, 6. haftada kardiyak disfonksiyonun tamamen gözlemlenebildiği diyabetik kardiyomiyopati geliştiği bilinmektedir. Diyabetik kardiyomiyopati oluşumuna neden olan mekanizmalardan önemli biri olan kalp kası Ca^{+2} homeostazisindeki bozulmanın SERCA, fosfolamban (PLB) ve CaMKII mRNA ve protein seviyelerinde değişikliklerden kaynaklandığı bildirilmiştir. Bunlardan özellikle PLB ve SERCA mRNA ve protein düzeyleri ile ilgili literatürde farklı ve birbiriyle çelişen sonuçlara rastlanmaktadır. PLB'nin aktifleşmesi yani fosforillenmesini sağlayan temel proteinlerden olan CaMKII aktivitesinin diyabetik kalplerde artmasına karşın; PLB'nin fosforilasyonunda, SERCA mRNA ve protein seviyelerindeki azalmanın Ca^{+2}'nin sitozolde aşırı birikimi ile diyastolik disfonksiyon gelişimine neden olduğu gösterilmiştir.

Diğer taraftan deney hayvanları ile yapılan birçok çalışmada aralıklı ve kronik hipoksinin kardiyak fonksiyonlarda iyileşme sağladığı gösterilmiştir. Anabilim Dalımızda yapılan deneysel bir çalışmada streptozotosin ile indüklenen Tip 1 diabetes mellitusa bağlı sol ventrikül fonksiyon bozukluğunda aralıklı hipoksinin diabetes mellitus gruplarında fonksiyonel iyileşme gösterdiği bulunmuştur. Streptozotosin ile indüklenen diyabetik kardiyomiyopatide aralıklı hipoksinin, PLB ve CaMKII mRNA düzeylerini arttıracağı hipoteziyle; aralıklı hipoksi uygulamasının diyabetik kardiyomiyopati gelişimindeki moleküler mekanizmaların anlaşılması ve diyabete bağlı kardiyak komplikasyonların engellenmesinde önleyici ve tedavi edici planlamaların oluşturulmasına katkıda bulunması amacıyla bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla 34 adet, 10 haftalık, Wistar Albino cinsi, erkek sıçanlar kontrol (K, n=7), aralıklı hipoksi (AH, n=9), diabetes mellitus (DM, n=8) ve diabetes mellitus + aralıklı hipoksi (DM+AH, n=10) olmak üzere 4 gruba ayrıldılar. 11. haftada streptozotosin enjekte edilerek diabetes mellitus oluşturuldu. 12. haftadan itibaren AH ve DM+AH gruplarındaki denekler 6 hafta süresince, günde 6 saat 3.000 m yüksekliğe karşılık gelen hipoksiye maruz bırakıldılar. Deney protokolünün son uygulamasından 24 saat sonra (43. gün) sakrifikasyon işlemi ile kalpleri çıkarılıp sol ventrikül kas dokuları ayrıştırıldı. Homojenize edilen dokudan total RNA eldesi ve

ardından semi konservatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile cDNA sentezlenip, uygun primerler kullanılarak PLB, CaMKII ve GAPDH PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi. Bunların agaroz jel elektroforezi ve UV kamera görüntülerinden bant yoğunluk analizleri yapılarak PLB/GAPDH ve CaMKII/GAPDH mRNA oranları belirlenerek CaMKII ve PLB mRNA olarak değerlendirildi.

Kruskal Wallis testi ile yapılan istatistiksel analiz sonucunda CaMKII mRNA düzeylerinin DM ve DM+AH gruplarında azalmış olduğu bulundu ($p<0,001$). PLB mRNA düzeylerinde ise değişiklik gözlenmedi.

Çalışmamızda sadece PLB ve CaMKII mRNA düzeylerinin saptanmış olması DM ve AH etkilerini açıklamayabilir. Translasyonel ve/veya posttranslasyonel düzeydeki etkiler ile protein düzeylerinde ve/veya aktivasyonlarında ortaya çıkabilecek değişimler de önemlidir. İleri çalışmalarda moleküllerin mRNA düzeyleri yanında, protein düzeyleri ve fosforile formları değerlendirilmelidir ve kalp fonksiyonlarıyla ilgili parametrelerin de çalışmaya dahil edilmesi gereklidir. Anabilim dalımızdaki çalışmalar bu yönde devam etmektedir.

Anahtar Sözcükler: Aralıklı Hipoksi, Ca^{+2} Homeostazisi, CaMKII, Diyabetik Kardiyomiyopati, Hipoksi, PLB, Tip 1 Diabetes Mellitus.

SUMMARY

Effect of Intermittent Hypoxia on Calcium Homeostasis of Experimental Type 1 Diabetes Mellitus Heart Muscle

Diabetic cardiomyopathy is one of the leading causes of morbidity and mortality of diabetes mellitus which is one of the world's major health problems. It is known that in rats with type 1 diabetes mellitus induced by streptozotocin, in 6th week, diabetic cardiomyopathy with complete cardiac dysfunction is developed. It is reported that an important mechanism of cardiac myopathy, Ca^{2+} homeostasis dysfunction, is caused by changes in SERCA, phospholamban (PLB) and CaMKII mRNA and protein levels. However, there are inconsistent results in literature, especially for SERCA and PLB mRNA levels. CaMKII (that is responsible for activation of PLB by phosphorylation) level reduces at diabetic hearths. Although CaMKII activity increases, PLB phosphorylation decreases. By diminishment of SERCA mRNA and protein levels, extreme accumulation of Ca^{2+} in cytosol causes diastolic dysfunction.

On the other hand, by experimental animal studies, it is shown that intermittent and chronic hypoxia can cause improvement in cardiac functions. In an experimental study that took place in our department showed that intermittent hypoxia causes functional improvement in streptozotocin induced diabetes mellitus group, which has left ventricular function disorder. This study is conducted with the hypothesis that intermittent hypoxia will induce PLB and CaMKII mRNA levels in streptozotocin-induced cardiomyopathy. The aim of the study is to understand the molecular mechanisms behind diabetic cardiomyopathy and contribute to development of a new treatment plan for diabetic cardiomyopathy malfunction.

For this purpose, 34, 10 week-old, Wistar Albino male rats are grouped as control (C, n=7), intermittent hypoxia (IH, n=9), diabetes mellitus (DM, n=8) and diabetes mellitus + intermittent hypoxia (DM+IH, n=10) groups. Diabetes mellitus is induced by streptozotosin injection in the 11th week. Beginning from the 12th week, IH and DM+IH groups are exposed to 6 hours of hypoxia which is equal to hypoxia at 3,000 meters high. 24 hours after the last application of experiment procedure (43rd day) left ventricule muscle tissue is isolated after sacrification. Total RNA is extracted from homojenized tissue and cDNA is synthetised by semi conservative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). With specific primers PLB, CaMKII, and GAPDH PCR amplifications are made. After agarose gel electrophoresis, band density is analyzed on UV camera images, PLB/GAPDH and CaMKII/GAPDH mRNA ratios are determined and CaMKII and PLB is evaluated as mRNA levels.

At the statistical analysis which is made with the analysis of Kruskal Wallis shows that for DM and DM+IH groups CaMKII mRNA levels are decreased ($p<0,001$). Meanwhile there was not any difference at PLB level.

Evaluation of only PLB and CaMKII mRNA levels on our study may not explain DM and IH effects. Changes in protein levels and/or activations by effects on translational and/or posttranslational level are also important. For future studies, it is necessary to evaluate protein levels and phosphorylated forms and also include hearth function parameters. Studies in our department are continuing in this direction.

Key Words: Intermittent Hypoxia, Ca^{2+} Homeostasis, CaMKII, Diabetic Cardiomyopathy, Hypoxia, PLB, Type 1 Diabetes Mellitus.

KAYNAKLAR

1. http://www.who.int/diabetes/facts/world figures/en/index4.html (05.09.2012).

2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, Harah K. Global prevalence of diabetes. Diabetes Care. 2004; 27: 1047–1053.

3. Sihem B, Dale AE. Diabetic cardiomyopathy revisited. Circulation. 2007; 115: 3213-3223.

4. Falcao-Pires I, Leite-Moreira AF. Diabetic cardiomyopathy: Understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment. Heart Fail Rev. 2012; 17: 325-344.

5. Jennifer E, Palmieri V, Mary J, Jonanthan N, Fabsitz R, Barbara V, Thomas K, Elisa T, Richard B. The Impact of diabetes on left ventricular filling pattern in normotensive and hypertensive adults: The strong heart study. Journal of the American College of Cardiology. 2001; 37: 1943–1949.

6. Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: The Framingham study. The American Journal of Cardiology. 1974; 34: 29–34.

7. Joffe II, Travers KE, Perreault-Micale CL, Hampton T. Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced, non–insulin-dependent diabetic rat. J Am Coll Cardiol. 1999; 34: 2111-2119.

8. Hoit BD, Castro C, Bultron G, Knight S, Matlib MA. Noninvasive evaluation of cardiac dysfunction by echocardiography in streptozotocin-induced diabetic rats. J Card Fail. 1999; 5: 324-333.

9. Trost SU, Belke DD, Bluhm WF, Meyer M, Swanson E, Dillmann WH. Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. Diabetes. 2002; 51: 1166-1171.

10. Zhao XY, Hu SJ, Li J, Mou Y, Chen BP, Xia Q. Decreased cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase activity contributes to cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. J Physiol Biochem. 2006; 62: 1-8.

11. Kim HW, Cho YS, Lee HR, Park SY, Kim YH. Diabetic alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase and phospholamban protein expression. Life Sciences. 2001; 70: 367-379.

12. Netticadan T, Temsah RM, Kent A, Elimban V, Dhalla NS. Depressed levels of Ca^{2+}-cycling proteins may underlie sarcoplasmic reticulum dysfunction in the diabetic heart. Diabetes. 2001; 50: 2133-2138.

13. Vasanji Z, Dhalla NS, Netticadan T. Increased inhibition of SERCA2 by phospholamban in the type I diabetic heart. Mol Cell Biochem. 2004; 261: 245-249.

14. Zhong Y, Ahmed S, Grupp IL, Matlib MA. Altered SR protein expression associated with contractile dysfunction in diabetic rat hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001; 281: H1137-1147.

15. Tuncay E, Zeydanli EN, Turan B. Cardioprotective effect of propranolol on diabetes-induced altered intracellular Ca^{2+} signaling in rat. J Bioenergy Biomembr. 2011; 43: 747-756.

16. Hattori Y, Matsuda N, Kimura J, Ishitani T, Tamada A, Gando S, Kemmotsu O, Kanno M. Diminished function and expression of the cardiac Na^{+}/Ca^{2+} exchanger in diabetic rats: implication in Ca^{2+} overload. J Physiol. 2000; 527: 85–94.

17. Kashihara H, Shi ZQ, Yu JZ, McNeill JH, Tibbits GF. Effects of diabetes and hypertension on myocardial Na^{+}/Ca^{2+} exchange. Can J Physiol Pharmacol. 2000; 78: 12–19.

18. Shishehbor MH, Hoogwerf BJ, Schoenhagen P, Marso SP, Sun JP, Li J, Klein AL, Thomas JD, and Garcia MJ. Relation of hemoglobin A1C to left ventricular relaxation in patients with type 1 Diabetes Mellitus and without overt heart disease. The American Journal of Cardiology. 2003; 91: 1514-1517.

19. Zubiate M. Diabetes mellitus and high altitude. Diabetologia Croatica. 2001; 30: 23-28.

20. Anderson JD, Honigman B. The effect of altitude-induced hypoxia on heart disease: do acute, intermittent, and chronic exposures provide cardioprotection. High Alt Med Biol. 2011; 12: 45-55.

21. Naghshin J, McGaffin KR, Witham WG. Chronic intermittent hypoxia increases left ventricular contractility in C57BL/6J mice. J Appl Physiol. 2009; 107: 787–793.

22. Asemu EF, Neckar J, Szarszi O, Papousek F. Effects of adaptation to intermittent high altitude hypoxia on ischemic ventricular arrhythmias in rats. Physiol. Res. 2000; 49: 597–606.

23. Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. Circulation. 2003; 108: 79–85.

24. Milano G, Corno AF, Lippa S, Von Segesser LK, Samaja M. Chronic and intermittent hypoxia induce different degrees of myocardial tolerance to hypoxia induced dysfunction. Exp Biol Med. 2002; 227: 389–397.

25. Baştuğ M, Dursun AD, Bilginoğlu A, Fıçıcılar H, Demirel HA, Turan B. Sıçanlarda Deneysel Tip 1 Diabetes Mellitusa Bağlı Sol Ventrikül Fonksiyon Bozukluğuna Aralıklı Hipobarik Hipoksinin Etkisi. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 34. Ulusal Kongresi Özetleri Kitabı. Erzurum. Syf 147, 06.10.2008.

26. Yu Z, Wang ZH, Yang HT. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II mediates cardioprotection of intermittent hypoxia against ischemic-reperfusion-induced cardiac dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009; 297: H735–H742.

27. Xie Y, Zhu Y, Zhu WZ, Chen L, Zhou ZN, Yuan WJ, Yang HT. Role of dual-site phospholamban phosphorylation in intermittent hypoxia-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005; 288: H2594-H2602.

28. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Yüce Yayımları/Tıp Kitapları Dizisi. 2007.

29. Candan İ, Oral D. Kardiyoloji. Ankara: Antıp A.Ş. Tıp kitapları ve bilimsel yayınları. 2002.

30. Katz AM. Physiology of the Heart. Physiology of the heart 4th ed. Published by Lippincott Williams & Wilkins in Philadelphia. 2006.

31. Periasamy M, Bhupathy P, Babu GJ. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. Cardiovascular Research. 2008; 77: 265–273.

32. Khavandi K, Khavandi A, Asghar O, Greenstein A, Withers S, Heagerty AM, Malik RA. Diabetic cardiomyopathy –a distinct disease? Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2009; 23: 347–360.

33. Bers DM, Bassanı JWM, Bassani RA. Na^{+}/Ca^{2+} exchange and Ca^{2+} fluxes during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. Annals New York Academy of Sciences. 1996; 779: 430-442.

34. Cerra MC, Imbrogno S. Phospholamban and cardiac function: a comparative perspective in vertebrates. Acta Physiol. 2012; 205: 9–25.

35. Netticadan T, Temsah RM, Kawabata K, Dhalla NS. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase is altered in heart failure. Circ Res. 2000; 86: 596-605.

36. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature. 2002; 415: 198–205.

37. Arai M, Alpert NR, MacLennan DH, Barton P, Periasamy M. Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure: a possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium. Circ Res. 1993; 72: 463–469.

38. Brandl CJ, de Leon S, Martin DR, MacLennan DH. Adult forms of the Ca^{2+}-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. J Biol Chem. 1987; 262: 3768–3774.

39. Brandl CJ, Green NM, Korczak B, MacLennan DH. Two Ca^{2+}-ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. Cell. 1986; 44: 597–607.

40. dela Bastie D, Levitsky D, Rappaport L, Mercadier JJ, Marotte F, Wisnewsky C, Brovkovich V, Schwartz K, Lompre AM. Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca^{2+}-ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. Circ Res. 1990; 66: 554–564.

41. Guntenski-Hamblin AM, Greeb JA, Shull GE. A novel Ca^{2+} pump expressing in brain, kidney, and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase gene. J Biol Chem. 1988; 263: 15032–15040.

42. Lytton J, MacLennan DH. Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca^{2+}-ATPase gene. J Biol Chem. 1988; 263: 15024–15031.

43. MacLennan DH, Brandl CJ, Korczak B, Green NM. Aminoacid sequence of a Ca^{2+}/Mg^{2+}-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. Nature. 1985; 316: 696–700.

44. Zarain-Herzberg A, MacLennan DH, Periasamy M. Characterization of rabbit cardiac sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase gene. J Biol Chem. 1990; 265: 4670–4677.

45. Dally S, Bredoux R, Corvazier E, Andersen JP, Clausen JD, Dode L, Fanchaouy M, Gelebart P, Monceau V, Del Monte F, Gwathmey JK, Hajjar R, Chaabane C, Bobe R, Raies A, Enouf J. Ca^{2+} ATPases in non-failing and failing heart: evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase 2 isoform (SERCA2c). Biochem J. 2006; 395: 249–258.

46. Bobe R, Bredoux R, Corvazier E, Lacabaratz-Porret C, MartinV, Kovacs T, Enouf J. How many Ca^{2+}-ATPase isoforms are expressed in a cell type? A growing family of membrane proteins illustrated by studies in platelets. Platelets. 2005; 16: 133–150.

47. Bobe R, Bredoux R, Wuytack F, Quarck R, Kovacs T, Papp B, Corvazier E, Magnier C, Enouf J. The rat platelet 97-kDa Ca^{2+}-ATPase isoform is the sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase 3 protein. J Biol Chem 1994; 269: 1417–1424.

48. Wuytack F, Dode L, Baba-Aissa F, Raeymaekers L. The SERCA3-type of organellar Ca^{2+} pumps. Biosci Rep. 1995; 15: 299–306.

49. Anger M, Samuel JL, Marotte F, Wuytack F, Rappaport L, Lompre AM. The sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase mRNA isoform, SERCA 3, is expressed in endothelial and epithelial cells in various organs. FEBS Lett. 1993; 334: 45–48.

50. Wuytack F, Papp B, Verboomen H, Raeymaekers L, Dode L, Bobe R, Enouf J, Bokkala S, Authi KS, Casteels R. A sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase 3-type Ca^{2+} pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells. J Biol Chem. 1994; 269: 1410–1416.

51. Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA Pump Isoforms: Their Role In Calcium Transport And Disease. Muscle Nerve. 2007; 35: 430–442.

52. Anger M, Samuel JL, Marotte F, Wuytack F, Rappaport L, Lompre AM. In situ mRNA distribution of sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase isoforms during ontogeny in the rat. J Mol Cell Cardiol. 1994; 26: 539–550.

53. Lompre AM, Anger M, Levitsky D. Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps in the cardiovascular system: function and gene expression. J Mol Cell Cardiol. 1994; 26: 1109–1121.

54. Lompre AM, Lambert F, Lakatta EG, Schwartz K. Expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase and calsequestrin genes in rat heart during ontogenic development and aging. Circ Res. 1991; 69: 1380–1388.

55. Reed TD, Babu GJ, Ji Y, Zilberman A, Ver Heyen M, Wuytack, Periasamy M. The expression of SR calcium transport ATPase and the Na^{+}/Ca^{2+} Exchanger are antithetically regulated during mouse cardiac development and in Hypo/hyperthyroidism. J Mol Cell Cardiol. 2000; 32: 453–464.

56. Gombosova I, Boknik P, Kirchhefer U, Knapp J, Luss H, Muller FU, Muller T, Vahlensieck U, Schmitz W, Bodor GS, Neumannet J. Postnatal changes in contractile

time parameters, calcium regulatory proteins, and phosphatases. Am J Physiol. 1998; 274: H2123–H2132.

57. Luss I, Boknik P, Jones LR, Kirchhefer U, Knapp J, Linck B, Lüss H, Meissner A, Müller FU, Schmitz W, Vahlensieck U, Neumann J. Expression of cardiac calcium regulatory proteins in atrium v ventricle in different species. J Mol Cell Cardiol. 1999; 31: 1299–1314.

58. Koss KL, Ponniah S, Jones WK, Grupp IL, Kranias EG. Differential phospholamban gene expression in murine cardiac compartments. Molecular and physiological analyses. Circ Res. 1995; 77: 342–353.

59. Minajeva A, Kaasik A, Paju K, Seppet E, Lompre AM, Veksler V, Ventura-Clapier R. Sarcoplasmic reticulum function in determining atrioventricular contractile differences in rat heart. Am J Physiol. 1997; 273: H2498–H2507.

60. Jiang MT, Moffat MP, Narayanan N. Age-related alterations in the phosphorylation of sarcoplasmic reticulum and myofibrillar proteins and diminished contractile response to isoproterenol in intact rat ventricle. Circ Res. 1993; 72: 102–111.

61. Lakatta EG. Myocardial adaptations in advanced age. Basic Res Cardiol. 1993; 88: 125–133.

62. Cain BS, Meldrum DR, Joo KS, Wang JF, Meng X, Cleveland JC Jr, Banerjee A, Harken AH. Human SERCA2a levels correlate inversely with age in senescent human myocardium. J Am Coll Cardiol. 1998; 32: 458–467.

63. Schmidt U, del Monte F, Miyamoto MI, Matsui T, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ. Restoration of diastolic function in senescent rat hearts through adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase. Circulation. 2000; 101: 790–796.

64. Bers DM. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. J Mol Cell Cardiol. 2004; 37: 417–429.

65. Periasamy M, Huke S. SERCA pump level is a critical determinant of Ca^{2+} homeostasis and cardiac contractility. J Mol Cell Cardiol. 2001; 33: 1053–1063.

66. Mork HK, Sjaastad I, Sande JB, Periasamy M, Sejersted OM, Louch WE. Increased cardiomyocyte function and Ca^{2+} transients in mice during early congestive heart failure. J Mol Cell Cardiol. 2007; 43: 177–186.

67. Simmerman HK, Jones LR. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. Physiol Rev. 1998; 78: 921–947.

68. Baker DL, Hashimoto K, Grupp IL, Ji Y, Reed T, Loukianov E, Grupp G, Bhagwhat A, Hoit B, Walsh R, Marban E, Periasamy M. Targeted overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase increases cardiac contractility in transgenic mouse hearts. Circ Res. 1998; 83: 1205–1214.

69. Loukianov E, Ji Y, Baker DL, Reed T, Babu J, Loukianova T, Greene A, Shull G, Periasamy. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase isoforms and their role in muscle physiology and pathology. Ann N Y Acad Sci. 1998; 853: 251–259.

70. Vetter R, Rehfeld U, Reissfelder C, Weiss W, Wagner KD, Gunther J, Hammes A, Tschöpe C, Dillmann W, Paul M. Transgenic overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase improves reticular Ca^{2+} handling in normal and diabetic rat hearts. FASEB J. 2002; 16: 1657–1659.

71. He H, Giordano FJ, Hilal-Dandan R, Choi DJ, Rockman HA, McDonough PM, Bluhm WF, Meyer M, Sayen MR, Swanson E, Dillmann WH. Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. J Clin Invest. 1997; 100: 380–389.

72. Loukianov E, Ji Y, Grupp IL, Kirkpatrick DL, Baker DL, Loukianova T, Grupp G, Lytton J, Walsh RA, Periasamy M. Enhanced myocardial contractility and increased Ca^{2+} transport function in transgenic hearts expressing the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase. Circ Res. 1998; 83: 889–897.

73. Ji Y, Lalli MJ, Babu GJ, Xu Y, Kirkpatrick DL, Liu LH, Chiamvimonvat N, Walsh RA, Shull GE, Periasamy M. Disruption of a single copy of the SERCA2 gene results in altered Ca^{2+} homeostasis and cardiomyocyte function. J Biol Chem. 2000; 275: 38073–38080.

74. Periasamy M, Reed TD, Liu LH, Ji Y, Loukianov E, Paul RJ, Nieman ML, Riddle T, Duffy JJ, Doetschman T, Lorenz JN, Shull GE. Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase isoform 2 (SERCA2) gene. J Biol Chem. 1999; 274: 2556–2562.

75. Shull GE, Okunade G, Liu LH, Kozel P, Periasamy M, Lorenz JN, Prasad V. Physiological functions of plasma membrane and intracellular Ca^{2+} pumps revealed by analysis of null mutants. Ann N Y Acad Sci. 2003; 986: 453–460.

76. Schultz J, Glascock BJ, Witt SA, Nieman ML, Nattamai KJ, Liu LH, Lorenz JN, Shull GE, Kimball TR, Periasamy M. Accelerated onset of heart failure in mice during pressure overload with chronically decreased SERCA2 calcium pump activity. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004; 286: H1146–H1153.

77. Ver Heyen M, Heymans S, Antoons G, Reed T, Periasamy M, Awede B, Lebacq J, Vangheluwe P, Dewerchin M, Collen D, Sipido K, Carmeliet P, Wuytack F. Replacement of the muscle-specific sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase isoform SERCA2a by the nonmuscle SERCA2b homologue causes mild concentric hypertrophy and impairs contraction–relaxation of the heart. Circ Res. 2001; 89: 838–846.

78. Arai M, Matsui H, Periasamy M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. Circ Res. 1994; 74: 555–564.

79. Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. Circ Res. 1994; 75: 434–442.

80. Movsesian MA, Karimi M, Green K, Jones LR. Ca^{2+}-transporting ATPase, phospholamban, and calsequestrin levels in nonfailing and failing human myocardium. Circulation. 1994; 90: 653–657.

81. Munch G, Bolck B, Hoischen S, Brixius K, Bloch W, Reuter H, Schwinger RH. Unchanged protein expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase, phospholamban, and calsequestrin in terminally failing human myocardium. J Mol Med. 1998; 76: 434–441.

82. del Monte F, Hajjar RJ, Harding SE. Overwhelming evidence of the beneficial effects of SERCA gene transfer in heart failure. Circ Res. 2001; 88: E66–E67.

83. del Monte F, Harding SE, Schmidt U, Matsui T, Kang ZB, Dec GW, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ. Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. Circulation. 1999; 100: 2308–2311.

84. MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003; 4: 566–577.

85. Brittsan AG, Kranias EG. Phospholamban and cardiac contractile function. J Mol Cell Cardiol. 2000; 32: 2131–2139.

86. Tada M. Molecular structure and function of phospholamban in regulating the calcium pump from sarcoplasmic reticulum. Ann N Y Acad Sci. 1992; 671: 92–102.

87. Tada M, Inui M. Regulation of calcium transport by the ATPase phospholamban system. J Mol Cell Cardiol. 1983; 15: 565–575.

88. Tada M, Ohmori F, Kinoshita N, Abe H. Cyclic AMP regulation of active calcium transport across membranes of sarcoplasmic reticulum: role of the 22,000-dalton protein phospholamban. Adv Cyclic Nucleotide Res. 1978; 9: 355–369.

89. Kadambi VJ, Kranias EG. Phospholamban: a protein coming of age. Biochem Biophys Res Commun. 1997; 239: 1–5.

90. Koss KL, Kranias EG. Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. Circ Res. 1996; 79: 1059–1063.

91. Mattiazzi A, Mundina-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. Cardiovasc Res. 2005; 68: 366–375.

92. Bhupathy P, Babu GJ, Periasamy M. Sarcolipin and phospholamban as regulators of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2007; 42: 903–911

93. Zhong Y, Reiser PJ, Matlib MA. Gender differences in myosin heavy chain-beta and phosphorylated phospholamban in diabetic rat hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003; 285: H2688–H2693.

94. Boknik P, Heinroth-Hoffmann I, Kirchhefer U, Knapp J, Linck B, Luss H, Müller T, Schmitz W, Brodde O, Neumann J. Enhanced protein phosphorylation in hypertensive hypertrophy. Cardiovasc Res. 2001; 51: 717–728.

95. Currie S, Smith GL. Enhanced phosphorylation of phospholamban and downregulation of sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase type 2 (SERCA 2) in cardiac sarcoplasmic reticulum from rabbits with heart failure. Cardiovasc Res. 1999; 41: 135–146.

96. Mills GD, Kubo H, Harris DM, Berretta RM, Piacentino V 3rd, Houser SR. Phosphorylation of phospholamban at threonine-17 reduces cardiac adrenergic contractile responsiveness in chronic pressure overload-induced hypertrophy. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006; 291: H61–H70.

97. Sande JB, Sjaastad I, Hoen IB, Bokenes J, Tonnessen T, Holt E, Lunde PK, Christensen G. Reduced level of serine (16) phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: a major contributor to reduced SERCA2 activity. Cardiovasc Res. 2002; 53: 382–391.

98. Schmidt U, Hajjar RJ, Kim CS, Lebeche D, Doye AA, Gwathmey JK. Human heart failure: cAMP stimulation of SR Ca^{2+}-ATPase activity and phosphorylation level of phospholamban. Am J Physiol. 1999; 277: H474–H480.

99. Schwinger RH, Munch G, Bolck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E. Reduced Ca^{2+}-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. J Mol Cell Cardiol. 1999; 31: 479–491.

100. Brixius K, Wollmer A, Bolck B, Mehlhorn U, Schwinger RH. Ser16-, but not Thr17-phosphorylation of phospholamban influences frequency dependent force generation in human myocardium. Pflugers Arch. 2003; 447: 150–157.

101. El-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, Zolk O, Eschenhagen T. Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. Cardiovasc Res. 2004; 61: 87–93.

102. Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. Circ Res. 1994; 75: 401–409.

103. Brittsan AG, Ginsburg KS, Chu G, Yatani A, Wolska BM, Schmidt AG, Asahi M, MacLennan DH, Bers DM, Kranias EG. Chronic SR Ca^{2+}-ATPase inhibition causes adaptive changes in cellular Ca^{2+} transport. Circ Res. 2003; 92: 769–776.

104. Haghighi K, Schmidt AG, Hoit BD, Brittsan AG, Yatani A, Lester JW, Zhai J, Kimura Y, Dorn GW 2nd, MacLennan DH, Kranias EG. Superinhibition of sarcoplasmic reticulum function by phospholamban induces cardiac contractile failure. J Biol Chem. 2001; 276: 24145–24152.

105. Kadambi VJ, Ponniah S, Harrer JM, Hoit BD, Dorn GW II, Walsh RA, Kranias EG. Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. J Clin Invest. 1996; 97: 533–539.

106. Kiriazis H, Kranias EG. Genetically engineered models with alterations in cardiac membrane calcium-handling proteins. Annu Rev Physiol. 2000; 62: 321–351.

107. Haghighi K, Kolokathis F, Gramolini AO, Waggoner JR, Pater L, Lynch RA, Fan GC, Tsiapras D, Parekh RR, Dorn GW 2nd, MacLennan DH, Kremastinos DT, Kranias EG. A mutation in the human phospholamban gene, deleting arginine 14, results in lethal, hereditary cardiomyopathy. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103: 1388–1393.

108. Haghighi K, Kolokathis F, Pater L, Lynch RA, Asahi M, Gramolini AO, Fan GC, Tsiapras D, Hahn HS, Adamopoulos S, Liggett SB, Dorn GW 2nd, MacLennan DH, Kremastinos DT, Kranias EG. Human phospholamban null results in lethal

dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. J Clin Invest. 2003; 111: 869–876.

109. Voss J, Jones LR, Thomas DD. The physical mechanism of calcium pump regulation in the heart. Biophys J. 1994; 67: 190–196.

110. Cornea RL, Jones LR, Autry JM, Thomas DD. Mutation and phosphorylation change the oligomeric structure of phospholamban in lipid bilayers. Biochemistry. 1997; 36: 2960–2967.

111. Zhai J, Schmidt AG, Hoit BD, Kimura Y, MacLennan DH, Kranias EG. Cardiac-specific overexpression of a superinhibitory pentameric phospholamban mutant enhances inhibition of cardiac function in vivo. J Biol Chem. 2000; 275: 10538–10544.

112. Miyamoto MI, del Monte F, Schmidt U, DiSalvo TS, Kang ZB, Matsui T, Guerrero JL, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ. Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97: 793–798.

113. Hajjar RJ, Schmidt U, Matsui T, Guerrero JL, Lee KH, Gwathmey JK, Dec GW, Semigran MJ, Rosenzweig A. Modulation of ventricular function through gene transfer in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95: 5251–5256.

114. Hajjar RJ, del Monte F, Matsui T, Rosenzweig A. Prospects for gene therapy for heart failure. Circ Res. 2000; 86: 616–621.

115. Hajjar RJ. The promise of gene therapy as a therapeutic modality in heart failure. J Med Liban. 2000; 48: 86–88.

116. del Monte F, Kizana E, Tabchy A, Hajjar RJ. Targeted gene transfer in heart failure: implications for novel gene identification. Curr Opin Mol Ther. 2004; 6: 381–394.

117. del Monte F, Lebeche D, Guerrero JL, Tsuji T, Doye AA, Gwathmey JK, Hajjar RJ. Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101: 5622–5627.

118. Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y, Martone ME, Wang Y, Ross J Jr, Kranias EG, Giles WR, Chien KR. Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. Cell. 1999; 99: 313–322.

119. del Monte F, Harding SE, Dec GW, Gwathmey JK, Hajjar RJ. Targeting phospholamban by gene transfer in human heart failure. Circulation. 2002; 105: 904–907.

120. Hoshijima M, Ikeda Y, Iwanaga Y, Minamisawa S, Date MO, Gu Y, Iwatate M, Li M, Wang L, Wilson JM, Wang Y, Ross J Jr, Chien. Chronic suppression of heart-failure progression by a pseudophosphorylated mutant of phospholamban via in vivo cardiac rAAV gene delivery. Nat Med. 2002; 8: 864-871.

121. Miller SG, Kennedy MB. Distinct forebrain and cerebellar isozymes of type II Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase associate differently with the postsynaptic density fraction. J Biol Chem. 1985; 260: 9039–9046.

122. Edman CF, Schulman H. Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. Biochim Biophys Acta. 1994; 1221: 89–101.

123. Srinivasan M, Edman CF, Schulman H. Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus. J Cell Biol. 1994; 126: 839–852.

124. Zhang T, Brown JH. Role of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. Cardiovasc Res. 2004; 63: 476-486.

125. Hoch B, Meyer R, Hetzer R, Krause EG, Karczewski P. Identification and expression of δ-isoforms of the multifunctional Ca^{2+}/calmodulin dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. Circ Res. 1999; 84: 713–21.

126. Hagemann D, Hoch B, Krause EG, Karczewski P. Developmental changes in isoform expression of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II delta-subunit in rat heart. J Cell Biochem. 1999; 74: 202–10.

127. Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, Belke DD, Dillmann WH, Rogers TB, Schulman H, Ross J Jr, Brown JH. The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. J Biol Chem. 2002; 277: 1261–1267.

128. Braun AP, Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. Annu Rev Physiol. 1995; 57: 417–445.

129. Schworer CM, Colbran RJ, Soderling TR. Reversible generation of a Ca^{2+}-independent form of Ca^{2+} (calmodulin)-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism. J Biol Chem. 1986; 261: 8581–8584.

130. Erickson JR, Joiner MA, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AL, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME. A

dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. Cell. 2008; 133: 462-474.

131. Colbran RJ. Inactivation of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II by basal autophosphorylation. J Biol Chem. 1993; 268: 7163–7170.

132. Anderson ME, Brown JH, Bers DM. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2011; 51: 468–473.

133. Kuret J, Schulman H. Mechanism of autophosphorylation of the multifunctional Ca^{2+}/calmodulindependent protein kinase. J Biol Chem. 1985; 260: 6427–6433.

134. Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin dependent protein kinase. Science. 1992; 256: 1199–1202.

135. Hoelz A, Nairn AC, Kuriyan J. Crystal structure of a tetradecameric assembly of the association domain of Ca^{2+}/calmodulin-dependent kinase II. Mol Cell. 2003; 11: 1241–1251.

136. Perrino BA. Regulation of gastrointestinal motility by Ca^{2+}/calmodulin-stimulated protein kinase II. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2011; 510: 174-181.

137. Pawson T, Scott JD. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. Science. 1997; 278: 2075–2080.

138. Dorn GW, Souroujon MC, Liron T, Chen CH, Gray MO, Zhou HZ, Csukai M, Wu G, Lorenz JN, Mochly-Rosen D. Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96: 12798–12803.

139. Gao T, Yatani A, Dell Acqua ML, Sako H, Green SA, Dascal N, Scott JD, Hosey MM. cAMP dependent regulation of cardiac L-type Ca^{2+} channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits. Neuron. 1997; 19: 185–196.

140. Johnson JA, Gray MO, Chen CH, Mochly-Rosen D. A protein kinase C translocation inhibitor as an isozyme-selective antagonist of cardiac function. J Biol Chem. 1996; 271: 24962–24966.

141. Dzhura I, Wu Y, Colbran RJ, Corbin JD, Balser JR, Anderson ME. Cytoskeletal disrupting agents prevent calmodulin kinase, IQ domain and voltage-dependent facilitation of L-type Ca^{2+} channels. J Physiol. 2002; 545: 399–406.

142. Wu Y, MacMillan LB, McNeill RB, Colbran RJ, Anderson ME. CaM kinase augments cardiac Ltype Ca^{2+} current: a cellular mechanism for long Q-T arrhythmias. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 1999; 276: H2168–H2178.

143. Alseikhan BA, De Maria CD, Colecraft HM, Yue DT. Engineered calmodulins reveal the unexpected eminence of Ca^{2+} channel inactivation in controlling heart excitation. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 17185–17190.

144. Shifman JM, Choi MH, Mihalas S, Mayo SL, Kennedy MB. Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) is activated by calmodulin with two bound calciums. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103: 13968–13973.

145. Berg, Tymoczko, and Stryer. Biochemistry. 5. Basım, 2001.

146. Huke S, Bers DM. Temporal dissociation of frequency-dependent acceleration of relaxation and protein phosphorylation by CaMKII. J Mol Cell Cardiol. 2007; 42: 590–599.

147. Colbran RJ, Smith MK, Schworer CM, Fong YL, Soderling TR. Regulatory domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Mechanism of inhibition and regulation by phosphorylation. J Biol Chem. 1989; 264: 4800–4804.

148. Kelly PT, Weinberger RP, Waxham MN. Active sitedirected inhibition of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase type II by a bifunctional calmodulin binding peptide. Proc Natl Acad Sci USA. 1988; 85: 4991–4995.

149. Smith MK, Colbran RJ, Brickey DA, Soderling TR. Functional determinants in the autoinhibitory domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Role of His282 and multiple basic residues. J Biol Chem. 1992; 267: 1761–1768.

150. Wu Y, Roden DM, Anderson ME. Calmodulin kinase inhibition prevents development of the arrhythmogenic transient inward current. Circ Res. 1999; 84: 906–912.

151. Anderson ME, Braun AP, Wu Y, Lu T, Wu Y, Schulman H, Sung RJ. KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca^{2+}/calmodulin dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. J Pharmacol Exp Ther. 1998; 287: 996–1006.

152. Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR. Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. Circ Res. 2004; 94: e61–e70.

153. Couchonnal LF, Anderson ME. The Role of Calmodulin Kinase II in Myocardial Physiology and Disease. Physiology. 2008; 23: 151-159.

154. Dzhura I, Wu Y, Colbran RJ, Balser JR, Anderson ME. Calmodulin kinase determines calcium dependent facilitation of L-type calcium channels. Nat Cell Biol. 2000; 2: 173–177.

155. Anderson ME, Braun AP, Schulman H, Premack BA. Multifunctional Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase mediates Ca^{2+}-induced enhancement of the L-type Ca^{2+} current in rabbit ventricular myocytes. Circ Res. 1994; 75: 854–861.

156. Xiao RP, Cheng H, Lederer WJ, Suzuki T, Lakatta EG. Dual regulation of Ca^{2+}/calmodulin-dependent kinase II activity by membrane voltage and by calcium influx. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91: 9659–9663.

157. Yuan W, Bers DM. Ca^{2+}-dependent facilitation of cardiac Ca^{2+} current is due to Ca^{2+}-calmodulin dependent protein kinase. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 1994; 267: H982–H993.

158. Wagner S, Dybkova N, Rasenack EC, Jacobshagen C, Fabritz L, Kirchhof P, Maier SK, Zhang T, Hasenfuss G, Brown JH, Bers DM, Maier LS. Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II regulates cardiac Na^{+} channels. J Clin Invest. 2006; 116: 3127–3138.

159. Maier LS, Zhang T, Chen L, De Santiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKIIdeltaC overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca^{2+} handling: reduced SR Ca^{2+} load and activated SR Ca^{2+} release. Circ Res. 2003; 92: 904–911.

160. Wu Y, Temple J, Zhang R, Dzhura I, Zhang W, Trimble R, Roden DM, Passier R, Olson EN, Colbran RJ, Anderson ME. Calmodulin kinase II and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy. Circulation. 2002; 106: 1288–1293.

161. Zeng J, Rudy Y. Early afterdepolarizations in cardiac myocytes: mechanism and rate dependence. Biophys J. 1995; 68: 949–964.

162. Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. Circ Res. 2001; 88: 1159–1167.

163. Howe CJ, Lahair MM, McCubrey JA, Franklin RA. Redox regulation of the calcium/calmodulin dependent protein kinases. J Biol Chem. 2004; 279: 44573–44581.

164. Zhu W, Woo AY, Yang D, Cheng H, Crow MT, Xiao RP. Activation of CaMKIIdeltaC is a common intermediate of diverse death stimuli-induced heart muscle cell apoptosis. J Biol Chem. 2007; 282: 10833–10839.

165. Erickson JR, He BJ, Grumbach IM, Anderson ME. CaMKII in the Cardiovascular System: Sensing Redox States. Physiol Rev. 2011; 91: 889–915.

166. Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J Jr, Bers DM, Brown JH. The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. Circ Res. 2003; 92: 912–919.

167. Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, Opiela MK, Backs J, Olson EN, Brown JH, Neef S, Maier SK, Maier LS. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. Circ Heart Fail. 2009; 2: 664–675.

168. Koval OM, Guan X, Wu Y, Joiner ML, Gao Z, Chen B, Grumbach IM, Luczak ED, Colbran RJ, Song LS, Hund TJ, Mohler PJ, Anderson ME. $Ca_{V1.2}$ beta-subunit coordinates CaMKII-triggered cardiomyocyte death and afterdepolarizations. Proc Natl Acad Sci USA. 2010; 107: 4996–5000.

169. Zhang R, Khoo MS, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Ni G, Price EE Jr, Thiel W, Guatimosim S, Song LS, Madu EC, Shah AN, Vishnivetskaya TA, Atkinson JB, Gurevich VV, Salama G, Lederer WJ, Colbran RJ, Anderson ME. Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. Nat Med. 2005; 11: 409–417.

170. Wu Y, Kimbrough JT, Colbran RJ, Anderson ME. Calmodulin kinase is functionally targeted to the action potential plateau for regulation of L-type Ca^{2+} current in rabbit cardiomyocytes. J Physiol. 2004; 554: 145–155.

171. Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca^{2+}/calmodulin dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure. Circ Res. 2005; 97: 1314–1322.

172. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblit N, Marks AR. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. Cell. 2000; 101: 365-376.

173. Currie S, Loughrey CM, Craig MA, Smith GL. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIdelta associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart. Biochem J. 2004; 377: 357–366.

174. Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. J Biol Chem. 1991; 266: 11144–11152.

175. Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, Zibrova D, Dybkova N, Steen A, Wagner S, Chen L, Brown JH, Bers DM, Maier LS. Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes. Circ Res. 2006; 98: 235–244.

176. Yang D, Zhu WZ, Xiao B, Brochet DX, Chen SR, Lakatta EG, Xiao RP, Cheng H. Ca^{2+}/calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of ryanodine receptors suppresses Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} waves in cardiac myocytes. Circ Res. 2007; 100: 399–407.

177. Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD. The sodium/calcium exchanger family-SLC8. Pflügers Arch. 2004; 447: 543–548.

178. Sipido KR, Maes M, Van de Werf F. Low efficiency of Ca^{2+} entry through the Na^{+}-Ca^{2+} exchanger as trigger for Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum. A comparison between L-type Ca^{2+} current and reverse-mode Na^{+}-Ca^{2+} exchange. Circ Res. 1997; 81: 1034–1044.

179. Toth A, Kiss L, Varro A, Nanasi PP. Potential therapeutic effects of Na^{+}/Ca^{2+} exchanger inhibition in cardiac diseases. Curr Med Chem. 2009; 16: 3294–3321.

180. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2012; 35: S64-71.

181. http://www.turkendokrin.org/files/pdf/diabetes_klvz2011_web.pdf

182. Mytasa DZ, Stougiannosa PN, Zairisb MN, Foussasb SG, Pyrgakisa VN, Kyriazisc IA. Diabetic myocardial disease: pathophysiology, early diagnosis and therapeutic options. Journal of Diabetes and Its Complications. 2009; 23: 273–282.

183. Redfield MM, Jacobsen SJ, Burnett JC, Mahoney DW, Bailey KR, Rodeheffer RJ. Burden of Systolic and Diastolic Ventricular Dysfunction in the Community: Appreciating the Scope of the Heart Failure Epidemic. Jama. 2003; 289: 194-202.

184. Poirier P, Bogaty P, Garneau C, Marois L, Jean-G. Dumesnil, Diastolic Dysfunction in Normotensive Men With Well-Controlled Type 2 Diabetes. Importance of maneuvers in echocardiographic screening for preclinical diabetic cardiomyopathy. Diabetes Care. 2001; 24: 5–10.

185. Shivalkar B, Dhondt D, Goovaerts I, Gaal LV, Bartunek J, Crombrugge PV, Vrints C. Flow Mediated Dilatation and Cardiac Function in Type 1 Diabetes Mellitus. Am J Cardiol. 2006; 97: 77–82.

186. Di Bonito P, Moio N, Cavuto L, Covino G, Murena E, Scilla C, Turco S, Capaldo B, Sibilio G. Early Detection of Diabetic Cardiomyopathy: Usefulness of Tissue Doppler İmaging. Diabetic Medicine. 2005; 22: 1720–1725.

187. Diabetes Mellitus and Cardiovascular Complications. Özcan Keskin, Bahattin Balcı. Kafkas J Med Sci. 2011; 1: 81–85.

188. http://www.turkdiab.org/page.aspx?u=1&s=26 (08.03.2013).

189. T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Ankara, 2011; Yayın no: 816.

190. Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy. Exp Diabetes Res. 2007; 2007: 1-12.

191. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. Diabetes. 1998; 47: 859–866.

192. Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, Lin J, Bierhaus A, Nawroth P, Hannak D, Neumaier M, Bergfeld R, Giardino I, Brownlee M. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. Nat Med. 2003; 9: 294–299.

193. Heath H, Paterson RA, Hart JC. Changes in the hydroxyproline, hexosamine and sialic acid of the diabetic human and beta, beta'-iminodipropionitriletreated rat retinal vascular systems. Diabetologia. 1967; 3: 515–518.

194. Ola MS, Berkich DA, Xu Y, King MT, Gardner TW, Simpson I, LaNoue KF. Analysis of glucose metabolism in diabetic rat retinas. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006; 290: E1057–E1067.

195. Pirart J. Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4,400 patients observed between 1947 and 1973 [in French]. Diabetes Metab. 1977; 3: 97–107.

196. Vinik AI, Holland MT, Le Beau JM, Liuzzi FJ, Stansberry KB, Colen LB. Diabetic neuropathies. Diabetes Care. 1992; 15: 1926–1975.

197. Sima AA, Zhang W, Grunberger G. Type 1 diabetic neuropathy and C-peptide. Exp Diabesity Res. 2004; 5: 65–77.

198. Tesfaye S, Stevens LK, Stephenson JM, Fuller JH, Plater M, Ionescu-Tirgoviste C, Nuber A, Pozza G, Ward JD. Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to glycaemic control and potential risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study. Diabetologia. 1996; 39: 1377–1384.

199. Dyck PJ, Davies JL, Wilson DM, Service FJ, Melton LJ 3rd, O'Brien PC. Risk factors for severity of diabetic polyneuropathy: intensive longitudinal assessment of the Rochester Diabetic Neuropathy Study cohort. Diabetes Care. 1999; 22: 1479–1486.

200. Sima AA, Sugimoto K. Experimental diabetic neuropathy: an update. Diabetologia. 1999; 42: 773–788.

201. Yagihashi S, Yamagishi S, Wada R. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: correlation with clinical signs and symptoms. Diabetes Res Clin Pract. 2007; 77: S184–S189.

202. Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. Diabetes. 2005; 54: 1626–1634.

203. Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DE, Brown DM, Goetz FC. Structural functional relationships in diabetic nephropathy. J Clin Invest. 1984; 74: 1143–1155.

204. Ng DP, Krolewski AS. Molecular genetic approaches for studying the etiology of diabetic nephropathy. Curr Mol Med. 2005; 5: 509–525.

205. Jones CA, Krolewski AS, Rogus J, Xue JL, Collins A, Warram JH. Epidemic of end-stage renal disease in people with diabetes in the United States population: do we know the cause? Kidney Int. 2005; 67: 1684–1691.

206. Strong JP, Mcgill HC Jr. The natural history of coronary atherosclerosis. Am J Pathol. 1962; 40: 37–49.

207. Di MD, Mohn A, Mokini ZH, Giannini C, Chiarelli F. Macroangiopathy in adults and children with diabetes: from molecular mechanisms to vascular damage (part 1). Horm Metab Res. 2006; 38: 691–705.

208. Lam CS, Roger VL, Rodeheffer RJ, Bursi F, Borlaug BA, Ommen SR, Kass DA, Redfield MM. Cardiac structure and ventricular-vascular function in persons with heart failure and preserved ejection fraction from olmsted county, minnesota. Circulation. 2007; 115: 1982–1990.

209. Tribouilloy C, Rusinaru D, Mahjoub H, Tartiere JM, Kesri-Tartiere L, Godard S, Peltier M. Prognostic impact of diabetes mellitus in patients with heart failure and preserved ejection fraction: a prospective five-year study. Heart. 2008; 94: 1450–1455.

210. Arvan S, Singal K, Knapp R, Vagnucci A. Subclinical left ventricular abnormalities in young diabetics. Chest. 1988; 93: 1031–1034.

211. Astorri E, Fiorina P, Contini GA, Albertini D, Magnati G, Astorri A, Lanfredini M. Isolated and preclinical impairment of left ventricular filling in insülin dependent and non-insulin dependent diabetic patients. Clin Cardiol. 1997; 20: 536–540.

212. Afzal N, Ganguly PK, Dhalla KS, Pierce GN, Singal PK, Dhalla NS. Beneficial effects of verapamil in diabetic cardiomyopathy. Diabetes. 1988; 37: 936–942.

213. Chou E, Suzuma I, Way KJ, Opland D, Clermont AC, Naruse K, Suzuma K, Bowling NL, Vlahos CJ, Aiello LP, King GL. Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in insulin-resistant and diabetic states: a possible explanation for impaired collateral formation in cardiac tissue. Circulation. 2002; 105: 373–379.

214. Coats AJ, Anker SD. Insulin resistance in chronic heart failure. J Cardiovasc Pharmacol. 2000; 35: S9–S14.

215. Bell DS. Diabetic cardiomyopathy. Diabetes Care. 2003; 26: 2949–2951.

216. Fischer VW, Barner HB, Larose LS. Pathomorphologic aspects of muscular tissue in diabetes mellitus. Hum Pathol. 1984; 15: 1127–1136.

217. Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, O'Grady MJ, Lee ET, Welty TK, Fabsitz RR, Robbins D, Rhoades ER, Howard BV. Impact of diabetes on cardiac structure and function: the strong heart study. Circulation. 2000; 101: 2271–2276.

218. Iribarren C, Karter AJ, Go AS, Ferrara A, Liu JY, Sidney S, Selby JV. Glycemic control and heart failure among adult patients with diabetes. Circulation. 2001; 103: 2668–2673.

219. Amato L, Paolisso G, Cacciatore F, Ferrara N, Ferrara P, Canonico S, Varricchio M, Rengo F. Congestive heart failure predicts the development of non-

insulin-dependent diabetes mellitus in the elderly. The osservatorio geriatrico regione campania group. Diabetes Metab. 1997; 23: 213–218.

220. Swan JW, Anker SD, Walton C, Godsland IF, Clark AL, Leyva F, Stevenson JC, Coats AJ. Insulin resistance in chronic heart failure: relation to severity and etiology of heart failure. J Am Coll Cardiol. 1997; 30: 527–532.

221. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. N Engl J Med. 1990; 323: 236–241.

222. Miles PD, Romeo OM, Higo K, Cohen A, Rafaat K, Olefsky JM. Tnf-alpha-induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone. Diabetes. 1997; 46: 1678–1683.

223. Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. J Biol Chem. 1999; 274: 1865–1868.

224. Eckel J, Reinauer H. Insulin action on glucose transport in isolated cardiac myocytes: signalling pathways and diabetes induced alterations. Biochem Soc Trans. 1990; 18: 1125–1127.

225. Liedtke AJ, DeMaison L, Eggleston AM, Cohen LM, Nellis SH. Changes in substrate metabolism and effects of excess fatty acids in reperfused myocardium. Circ Res.1988; 62: 535–542.

226. Nakayama H, Morozumi T, Nanto S, Shimonagata T, Ohara T, Takano Y, Kotani J, Watanabe T, Fujita M, Nishio M, Kusuoka H, Hori M, Nagata S. Abnormal myocardial free fatty acid utilization deteriorates with morphological changes in the hypertensive heart. Jpn Circ J. 2001; 65: 783–787.

227. Rodrigues B, Cam MC, McNeill JH. Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy. Mol Cell Biochem. 1998; 180: 53–57.

228. Seddon M, Looi YH, Shah AM. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. Heart. 2007; 93: 903–907.

229. Liang Q, Carlson EC, Donthi RV, Kralik PM, Shen X, Epstein PN. Overexpression of metallothionein reduces diabetic cardiomyopathy. Diabetes. 2002; 51: 174–181.

230. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, Nadal-Ginard B, Anversa P. Myocardial cell death in human diabetes. Circ Res. 2000; 87: 1123–1132.

231. Privratsky JR, Wold LE, Sowers JR, Quinn MT, Ren J. At1 blockade prevents glucose-induced cardiac dysfunction in ventricular myocytes: role of the at1 receptor and nadph oxidase. Hypertension. 2003; 42: 206–212.

232. Mizushige K, Yao L, Noma T, Kiyomoto H, Yu Y, Hosomi N, Ohmori K, Matsuo H. Alteration in left ventricular diastolic filling and accumulation of myocardial collagen at insülin resistant prediabetic stage of a type II diabetic rat model. Circulation. 2000; 101: 899–907.

233. Brunner F, Bras-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. Pharmacol Ther. 2006; 111: 508–531.

234. Chen S, Evans T, Mukherjee K, Karmazyn M, Chakrabarti S. Diabetes-induced myocardial structural changes: role of endothelin-1 and its receptors. J Mol Cell Cardiol. 2000; 32: 1621–1629.

235. Aronson D. Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes. J Hypertens. 2003; 21: 3–12.

236. Uusitupa MI. Fibre in the management of diabetes. BMJ. 1990; 301: 122.

237. Yang Z, Zingarelli B, Szabo C. Effect of genetic disruption of poly (adp-ribose) synthetase on delayed production of inflammatory mediators and delayed necrosis during myocardial ischemia-reperfusion injury. Shock. 2000; 13: 60–66.

238. Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z, Szabo C, Brownlee M. Inhibition of gapdh activity by poly (adp-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. J Clin Invest. 2003; 112: 1049–1057.

239. Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Mabley JG, Szabo E, Szabo C. The role of poly (adp-ribose) polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes. Diabetes. 2002; 51: 514–521.

240. Way KJ, Isshiki K, Suzuma K, Yokota T, Zvagelsky D, Schoen FJ, Sandusky GE, Pechous PA, Vlahos CJ, Wakasaki H, King GL. Expression of connective tissue growth factor is increased in injured myocardium associated with protein kinase c beta2 activation and diabetes. Diabetes. 2002; 51: 2709–2718.

241. Wakasaki H, Koya D, Schoen FJ, Jirousek MR, Ways DK, Hoit BD, Walsh RA, King GL. Targeted overexpression of protein kinase c beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94: 9320–9325.

242. Zarich SW, Nesto RW. Diabetic cardiomyopathy. Am Heart J. 1989; 118: 1000–1012.

243. Mantysaari M, Kuikka J, Mustonen J, TahvanainenK, Vanninen E, Lansimies E, UusitupaM. Noninvasive detection of cardiac sympathetic nervous dysfunction in

diabetic patients using [123i]metaiodobenzylguanidine. Diabetes. 1992; 41: 1069–1075.

244. Schnell O, Muhr D, Weiss M, Dresel S, Haslbeck M, Standl E. Reduced myocardial 123i-metaiodobenzylguanidine uptake in newly diagnosed iddm patients. Diabetes. 1996; 45: 801–805.

245. Yoon YS, Uchida S, Masuo O, Cejna M, Park JS, Gwon HC, Kirchmair R, Bahlman F, Walter D, Curry C, Hanley A, Isner JM, Losordo DW. Progressive attenuation of myocardial vascular endothelial growth factor expression is a seminal event in diabetic cardiomyopathy: restoration of microvascular homeostasis and recovery of cardiac function in diabetic cardiomyopathy after replenishment of local vascular endothelial growth factor. Circulation. 2005; 111: 2073–2085.

246. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. J Clin Invest. 1991; 87: 432–438.

247. Sebbag L, Forrat R, Canet E, Wiernsperger N, Delaye J, Renaud S, De Lorgeril M. Effect of experimental non-insulin requiring diabetes on myocardial microcirculation during ischaemia in dogs. Eur J Clin Invest. 1994; 24: 686–690.

248. Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in β Cells of the Rat Pancreas. Physiol Res. 2001; 50: 536-546.

249. Kurçer Z, Karaoğlu D. The use of Alloxan and Streptozotocin in Experimental Diabetes Models. Turk Jem. 2012; 16: 34-40.

250. Ewis SA, Abdel-Rahman MS. Effect of metformin on glutathione and magnesium in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. J Appl Toxicol. 1995; 15: 387-90.

251. Dewhurst M, Omawari N, and Tomlinson DR. Aminoguanidine effects on endoneurial vasoactive nitric oxide and on motor nerve conduction velocity in control and streptozotocin-diabetic rats. British Journal of Pharmacology. 1997; 120: 593-598.

252. Aksoy N, Vural H, Sabuncu T, Aksoy Ş. Effects of melatonin on oxidative antioxidative status of tissues in streptozotocin-induced diabetic rats. Cell Biochem Funct. 2003; 21: 121–125.

253. Patel KP, Zhang PL. Attenuated renal responses to atrial natriuretic factor in streptozotocin-induced diabetic rats. Can J Physiol Pharmacol. 1990; 68: 425-30.

254. Bugger H, Abel ED. Rodent models of diabetic cardiomyopathy. Disease Models & Mechanisms. 2009; 2: 454-466.

255. Taylor AT. High-altitude illnesses: Physiology, risk factors, prevention, and treatment. RMMJ. 2011; 2: 1-18.

256. Prabhakar NR. Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms. J Appl Physiol. 2001; 90: 1986-1994.

257. Gidday JM. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. Nat Rev Neurosci. 2006; 7: 437-448.

258. Sharp FR, Bernaudin M. HIF1 and oxygen sensing in the brain. Nat Rev Neurosci. 2004; 5: 437-448.

259. Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, MacKenzia ET, Petit E, Schumann-Bard P. Normobaric Hypoxia Induces Tolerance to Focal Permanent Cerebral Ischemia in Association With an Increased Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 and Its Target Genes, Erythropoietin and VEGF, in the Adult Mouse Brain. Cereb J. Blood Flow Metab. 2002; 22: 393–403.

260. Jones NM and Bergeron M. Hypoxic Preconditioning Induces Changes in HIF1 Target Genes in Neonatal Rat Brain. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2001; 21: 1105–1114.

261. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. From the Cover: Erythropoietin crosses the blood–brain barrier to protect against experimental brain injury. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97: 10526–10531.

262. Prass K, Scharff A, Ruscher K, Lowl D, Muselmann C, Victorov I, Kapinya K, Dirnagl U, Meisel A. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. Stroke. 2003; 34: 1981-1986.

263. Lawrence MS, Ho DY, Dash R, and Sapolsky RM. Herpes simplex virus vectors over expressing the glucose transporter gene protect against seizure-induced neuron loss. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92: 7247–7251.

264. Loor G, Schumacker PT. Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia–reperfusion. Cell Death and Differentiation. 2008; 15: 686–690.

265. Xie Y, Zhu WZ, Zhu Y, Chen L, Zhou ZN, Yang HT. Intermittent high altitude hypoxia protects the heart against lethal Ca^{2+} overload injury. Life Sci. 2004; 76: 559–572.

266. Chen L, Lu XY, Li J, Fu JD, Zhou ZN, Yang HT. Intermittent hypoxia protects cardiomyocytes against ischemia-reperfusion injury-induced alterations in Ca^{2+} homeostasis and contraction via the sarcoplasmic reticulum and Na^{+}/Ca^{2+} exchange mechanisms. Am J Physiol Cell Physiol. 2006; 290: C1221-C1229.

267. Osada M, Netticadan T, Kawabata K, Tamura K, Dhalla NS. Ischemic preconditioning prevents I/R-induced alterations in SR calcium-calmodulin protein kinase II. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000; 278: H1791–H1798.

268. Osada M, Netticadan T, Tamura K, Dhalla NS. Modification of ischemia-reperfusion-induced changes in cardiac sarcoplasmic reticulum by preconditioning. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 1998; 274: H2025–H2034.

269. Said M, Vittone L, Mundina-Weilenmann C, Ferrero P, Kranias EG, Mattiazzi A. Role of dual-site phospholamban phosphorylation in the stunned heart: insights from phospholamban site-specific mutants. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003; 285: H1198–H1205.

270. Mattiazzi A, Hove-Madsen L, Bers DM. Protein kinase inhibitors reduce SR Ca^{2+} transport in permeabilized cardiac myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 1994; 267: H812–H820.

271. Abeeleh MA. Induction of Diabetes Mellitus in Rats Using Intraperitoneal Streptozotocin: A Comparison between 2 Strains of Rats. European Journal of Scientific Research. 2009; 32: 398-402.

272. Dursun AD. Kısa dönem antremanın iskelet kasında kaveolin ve VEGF ekspresyonu üzerine etkisi. AÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi. 2011.

273. Mirit E, Gross C, Hasin Y, Palmon A, Horowitz M. Changes in cardiac mechanics with heat acclimation: adrenergic signaling and SR-Ca^{2+} regulatory proteins Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000; 279: R77-R85.

274. Schworer CM, Rothblum LI, Thekkumkara TJ, Singer HA. Identification of novel isoforms of the d-subunit of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II. J Biol Chem. 1993; 268: 14443–14449.

275. http://rsbweb.nih.gov/ij/download.htlm

276.http://publib.boulder.ibm.com/infocenter/spssstat/v20r0m0/index.jsp?topic=%2Fcom.ibm.spss.statistics.help%2Falg_nonparametric_multiplecomparisons_pairwise.htm (07.02.2013).

277. Bedoya FJ, Solano F, Lucas M. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. Experientia. 1996; 52: 344-347.

278. Wagner S, Ruff HM, Weber SL, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, Anderson ME, Grandi E, Bers DM, Backs J, Belardinelli L, Maier LS. Reactive Oxygen Species–Activated Ca^{2+}/Calmodulin Kinase II Is Required for Late I_{Na} Augmentation Leading to Cellular Na^{+} and Ca^{2+} Overload. Circ Res. 2011; 108: 555-565.

279. Yeung HM, Kravtsov GM, Ng KM, Wong TM, Fung ML. Chronic intermittent hypoxia alters Ca^{2+} handling in rat cardiomyocytes by augmented Na^{+}/Ca^{2+} exchange and ryanodine receptor activities in ischemia-reperfusion. Am J Physiol Cell Physiol. 2007; 292: C2046-C2056.

280. Bekeredjian R, Walton CB, MacCannell KA, Ecker J, Kruse F, Outten JT, Sutcliffe D, Gerard RD, Bruick RK, Shohet RV. Conditional HIF-1a Expression Produces a Reversible Cardiomyopathy. Plos One. 2010; 5: e11693.

281. Yuan G, Nanduri J, Bhasker CR, Semenza GL, Prabhakar NR. Ca^{2+}/Calmodulin Kinase-dependent activation of Hypoxia Inducible Factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia. The Journal of Biological Chemistry. 2006; 280: 4321-4328.

282. Czibik G. Complex role of the HIF system in cardiovascular biology. J Mol Med. 2010; 88: 1101–1111.

283. Temsah RM, Kawabata K, Chapman D, Dhalla NS. Preconditioning prevents alterations in cardiac SR gene expression due to ischemia reperfusion. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002; 282: H1461–H1466.

284. Temsah RM, Netticadan T, Chapman D, Takeda S, Mochizuki S, and Dhalla NS. Alterations in sarcoplasmic reticulum function and gene expression in ischemic-reperfused rat heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 1999; 277: H584–H594.

285. Wu QY, Feher JJ. Effect of ischemia on the fraction of ryanodine sensitive cardiac sarcoplasmic reticulum. J Mol Cell Cardiol. 1997; 29: 1363–1373.

286. Zhang Y, Zhong N, Zhou ZN. Effects of intermittent hypoxia on action potential and contraction in non-ischemic and ischemic rat papillary muscle. Life Sci. 2000; 67: 2465–2471.

287. Bassani RA, Altamirano J, Puglisi JL, Bers DM. Action potential duration determines sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} reloading in mammalian ventricular myocytes. J Physiol. 2004; 559: 593–609.

288. Piper HM, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia- reperfusion injury. Ann Thorac Surg. 2003; 75: S644–S648.

289. Gao WD, Atar D, Backx PH, Marban E. Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium: direct evidence for decreased myofilament Ca^{2+} responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle. Circ Res. 1995; 76: 1036–1048.

290. Cross HR, Kranias EG, Murphy E, Steenbergen C. Ablation of PLB exacerbates ischemic injury to a lesser extent in female than male mice: protective role of NO. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003; 284: H683–H690.

291. Hulme JT, Colyer J, Orchard CH. Acidosis alters the phosphorylation of Ser16 and Thr17 of phospholamban in rat cardiac muscle. Pflügers Arch. 1997; 434: 475–483.

292. Harrison SM, Frampton JE, McCall E, Boyett MR, Orchard CH. Contraction and intracellular Ca^{2+}, Na^{+}, and H^{+} during acidosis in rat ventricular myocytes. Am J Physiol Cell Physiol. 1992; 262: C348–C357.

293. Mundina-Weilenmann C, Vittone L, Cingolani HE, Orchard CH. Effects of acidosis on phosphorylation of phospholamban and troponin I in rat cardiac muscle. Am J Physiol Cell Physiol. 1996; 270: C107–C114.

294. Ingwall JS, Weiss RG. Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. Circ Res. 2004; 95: 135–145.

295. Tian R, Halow JM, Meyer M, Dillmann WH, Figueredo VM, Ingwall JS, Camacho SA. Thermodynamic limitation for Ca^{2+} handling contributes to decreased contractile reserve in rat hearts. Am J Physiol. 1998; 275: H2064–H2071.

296. Neubauer S, Horn M, Naumann A, Tian R, Hu K, Laser M, Friedrich J, Gaudron P, Schnackerzand K, Ingwallet JS. Impairment of energy metabolism in intact residual myocardium of rat hearts with chronic myocardial infarction. J Clin Invest. 1995; 95: 1092–1100.

297. del Monte F, Williams E, Lebeche D, Schmidt U, Rosenzweig A, Gwathmey JK, Lewandowski ED, Hajjar RJ. Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase in a rat model of heart failure. Circulation. 2001; 104: 1424–1429.

298. Hochachka PW. Mechanism and Evolution of Hypoxia-Tolerance in Humans. The Journal of Experimental Biology. 1998; 201: 1243–1254.

299. Essop MF. Cardiac metabolic adaptations in response to chronic Hypoxia. J Physiol. 2007; 584: 715–726.

300. Boehm EA, Jones BE, Radda GK, Veech RL, Clarke K. Increased uncoupling proteins and decreased efficiency in palmitate-perfused hyperthyroid rat heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001; 280: H977–H983.

301. Serebrovskaya TV. Intermittent hypoxia research in the former soviet union and the commonwealth of independent States: history and review of the concept and selected applications. High Alt Med Biol. 2002; 3: 205-21.

302. Sivitz WI, Lund DD, Yorek B, Grover-McKay M, Schmid PG. Pretranslational regulation of two cardiac glucose transporters in rats exposed to hypobaric hypoxia. Am J Physiol. 1992; 263: E562-E569.

303. Sharma S, Taegtmeyer H, Adrogue J, Razeghi P, Sen S, Ngumbela K, and Essop MF. Dynamic changes of gene expression in hypoxia-induced right ventricular hypertrophy. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004; 286: H1185–H1192.

304. Daneshrad Z, Garcia-Riera MP, Verdys M, Rossi A. Differential responses to chronic hypoxia and dietary restriction of aerobic capacity and enzyme levels in the rat myocardium. Mol Cell Biochem. 2000; 210: 159-66.

305. Razeghi P, Young ME, Abbasi S, Taegtmeyer H. Hypoxia in vivo decreases peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated gene expression in rat heart. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 287: 5-10.

EKLER

EK 1.Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

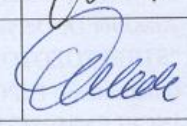
TOPLANTI TARİHİ :23/05/2012
TOPLANTI NO :2012-11
DOSYA NO :2012-33
KARAR NO :2012-11-79

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Metin Baştuğ ve Prof.Dr.Hakan Fıçıcılar'ın araştırma yürütücüsü oldukları, Prof.Dr.Metin Baştuğ, Prof.Dr.Hakan Fıçıcılar, Prof.Dr.Belma Turan, Uzm.Dr.Ali Doğan Dursun, Araş.Gör.Dr.Ayhan Tanyeli, Araş.Gör.Dr.Derya Güzel Biten ve Araş.Gör.Bio.Fırat Akat'ın ortak çalışmaları olan "STREPTOZOTOSİN İLE İNDÜKLENEN DİYABETİK KARDİYOMİYOPATİDE ARALIKLI (intermittent) HİPOKSİNİN ETKİLERİNİN FONKSİYONEL ve MOLEKÜLER TEKNİKLERLE İNCELENMESİ" başlıklı çalışmaları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışmanın Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre;

☒ Uygun bulunarak onaylanmasına,
☐ Düzeltilmesine,
oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL ÜYELERİ

Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.Oğuz SARIMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Uzm.Vet.Hek.Attila İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	

EK 2.GAPDH Primer Kalite Sertifikası

Quality Certificate

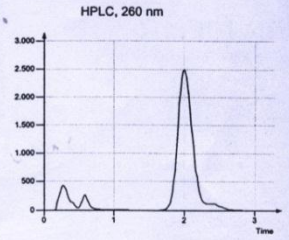
Thermo SCIENTIFIC

Prizma Laboratory Products Ind.&Trade Co.Ltd. Molecular Biology Ayhan Uckun
Acibadem Cad. No. 43 Kat 3 TR-34718 Kadikoy-Istanbul

RT-GAPDH-F 1087,2 µl. 25 pmol/µl.

Amount	5,3 OD 27,2 nmol 163,2 µg	Length	20 55,0 %	ID#	OR233536-7 Scale 0,02
Tm	53,6 °C	A G C T		Purification / Quality Control	HPLC
Volume for 100 pmol/µl	271,8 µl	3,0 3,0 8,0 6,0		Date	08.05.2007
Molecular weight	6004,9 g/mol			State	Dried

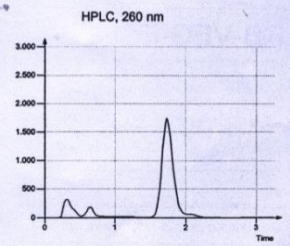
5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'



RT-GAPDH-R 1144,8 µl. 25 pmol/µl.

Amount	6,0 OD 28,6 nmol 171,5 µg	Length	20 55,0 %	ID#	OR233536-8 Scale 0,02
Tm	52,6 °C	A G C T		Purification / Quality Control	HPLC
Volume for 100 pmol/µl	286,2 µl	6,0 2,0 9,0 3,0		Date	08.05.2007
Molecular weight	5992,0 g/mol			State	Dried

5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'



EK 3.PLB Primer Kalite Sertifikası

Quality Certificate

Ayhan Uckun

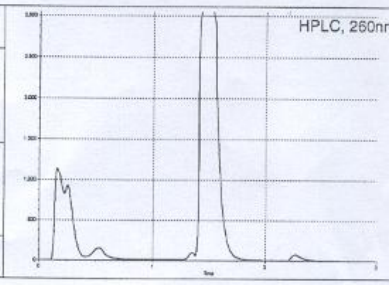
Page 22

50 nmol suland

PLB UP

Yield	OD 260nm	13,0 OD	Scale	0,20 µMOL	ID#	20235223
	Molar Amount	63,3 nmol	Length	21		FF318800-64
	Amount	399,6 µg	GC content	52,4%		SO318982-64
Tm		50,8 °C	Base Count		Date of Synthesis	
			A G C T		08.08.12	
Volume for 100 pmol/µl		633,4 µl	3,0 3,0 8,0 7,0		Purification	
					Standard-HPLC	
Molecular weight		6.309,1 g/mol	Oligo - DNA unmodified		State	Dried

HPLC, 260nm



5' - TACCTTACTCGCTCGGCTATC - 3'

5': 3':

50 nmol suland

PLB DOWN

Yield	OD 260nm	12,8 OD	Scale	0,20 µMOL	ID#	20235224
	Molar Amount	48,9 nmol	Length	22		FF318800-65
	Amount	330,7 µg	GC content	45,5%		SO318982-65
Tm		53,3 °C	Base Count		Date of Synthesis	
			A G C T		08.08.12	
Volume for 100 pmol/µl		489,1 µl	9,0 5,0 5,0 3,0		Purification	
					Standard-HPLC	
Molecular weight		6.762,5 g/mol	Oligo - DNA unmodified		State	Dried

HPLC, 260nm



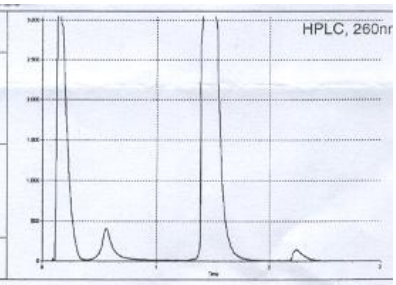
5' - CAGAAGCATCACAATGATGCAG - 3'

EK 4.CaMKII Primer Kalite Sertifikası

CAMKII COM

Yield	OD 260nm	18,6 OD	Scale	0,20 µMOL	ID#	20235225			
	Molar Amount	55,9 nmol	Length	31	FF318800-66				
	Amount	530,8 µg	GC content	48,4%	SO318982-66				
Tm		66,9 °C	Base Count		Date of Synthesis				
			A	G	C	T	09.08.12		
Volume for 100 pmol/µl		559,5 µl	7,0	7,0	8,0	9,0	Purification		
							Standard-HPLC		
Molecular weight		9.487,2 g/mol	Oligo - DNA unmodified		State	Dried			

3' - TCCTCCGTGGAGAAACACCGTTTTGTAGACT - 5'



CAMKII C

Yield	OD 260nm	14,7 OD	Scale	0,20 µMOL	ID#	20235227			
	Molar Amount	40,7 nmol	Length	31	FF318800-68				
	Amount	393,6 µg	GC content	54,8%	SO318982-68				
Tm		68,8 °C	Base Count		Date of Synthesis				
			A	G	C	T	10.08.12		
Volume for 100 pmol/µl		406,6 µl	9,0	12,0	5,0	5,0	Purification		
							Standard-HPLC		
Molecular weight		9.575,3 g/mol	Oligo - DNA unmodified		State	Dried			

5' - CCGGATGGGGTAAAGGAGTCAACTGAGAGCT - 3'

