

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI**

**DİYABETİK KARDİYOMİYOPATİDE**  
**ANJİYOTENSİN (1-7) SİNYALİNİN**  
**UYARILMA-KASILMA ÇİFTLENİMİ ÜZERİNE**  
**ETKİLERİ VE MEKANİZMASI**

Uğur DALAMAN

DOKTORA TEZİ

2020-ANTALYA

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI**

**DİYABETİK KARDİYOMİYOPATİDE**  
**ANJİYOTENSİN (1-7) SİNYALİNİN**  
**UYARILMA-KASILMA ÇİFTLENİMİ ÜZERİNE**  
**ETKİLERİ VE MEKANİZMASI**

Uğur DALAMAN

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Nazmi YARAŞ**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2017-2727 proje numarası ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından 117S066 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2020-ANTALYA

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bigli ve tecrübesiyle yolumu aydınlatan, akademisyenin nasıl bir bakış açısına sahip olması gerektiğini öğreten, nasıl ve hangi amaçlar doğrultusunda ilerlemeliyim sorusuna cevap bulmamda yol göstereci olan danışmanım Prof. Dr. Nazmi YARAŞ’a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez aşamamda bilgileri, yönlendirmeleri ve önerileriyle doktora tezimi kapsamlı ve detaylı bir şekilde oluşturmamı sağlayan tez danışmanlarım Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Semir ÖZDEMİR ve Kardiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İbrahim BAŞARICI’ya saygılarımı sunarım.

Doktora tez çalışmamda deneysel süreçlerde katkılarıyla destek olan Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Nihal Öztürk ERBOĞA ve Araş. Gör. Orhan ERKAN’a teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel süreçlerimde desteklerini esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi personeline saygılarımı sunarım.

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına lisansüstü eğitimim süresince vermiş oldukları destek ve yardımlardan ötürü teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitim sürecinde birlikte görev yaptığım, destekleriyle yanımda olan Doç. Dr. Hasan ÖZDOĞAN ve Öğr. Gör. Yiğit Ali ÜNCÜ’ye ve Biyofizik Anabilim Dalında görevli bütün mesai arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez sürecimin başından itibaren desteklerini esirgemeyen Uzm. Dr. Hüseyin MUTLU’ya saygılarımı sunarım.

Bana doğru bildiklerimden asla şaşmamam gerektiğini ve insan olmanın ne demek olduğunu öğreten, bu süreçteki zor zamanlarımda her konuda destek olan ve evlatları olmaktan gurur duyduğum annem Emekli Öğretmen Gülay DALAMAN’a, babam Emekli Öğretmen Celal DALAMAN’a ve kardeşim Mustafa Onur DALAMAN’a huzurlarınızda teşekkür ederim.

## ÖZET

**Amaç:** Renin-Angiotensin sistemi (RAAS)'nin diyabetik kardiyomiyopatide (DKM) kritik rol oynadığı bilinmektedir. Bu sistemin yeni elemanları olarak tanınan angiotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) ve angiotensin (1-7)/Mas reseptör aksının DKM'nin gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Çalışmada, DKM'de bozulan uyarılma-kasılma çiftlenimine, kardiyak patolojilerin hücresel düzeylerinde olumlu etkileri gözlenen Ang (1-7) molekülünün olası etkilerini ve bu etkilerinin mekanizmalarını aydınlatmaktır.

**Yöntem:** Ang (1-7) (600 µg/kg/gün), STZ (50 mg/kg; tek doz) ile deneysel diyabet modeli oluşturulan Wistar ratlara 30 gün i.p. olarak uygulanmıştır. Organ düzeyindeki değişimleri gözlemek için EKG ve sol ventrikül basınç-hacim döngüsü, kardiyomiyosit düzeyinde ise patch-clamp ve fluorometrik yöntemlerle uyarılma-kasılma çiftlenimi değerlendirilmiştir. Ayrıca western-blot yöntemiyle hücre içi  $Ca^{2+}$  homeostazında görevli proteinler ve lokal RAAS elemanlarının seviyeleri ve aktiviteleri ölçülmüştür.

**Bulgular:** Diyabet, atım hacmi, kalp debisi ve kalp işini bozarak kardiyak verimi azaltmıştır. Bununla beraber gevşeme süresini uzatmış, dolum hızını yavaşlatmış ve arteriyel elastansı arttırarak ventrikülo-arteryel eşleşmeyi bozmuştur. Bu değişimler DKM'de diyastolik fonksiyon bozukluğuna neden olmakta, Ang (1-7) bu değişimleri engelleyerek fonksiyon bozukluğunun gelişmesini önlemektedir. DKM'de  $I_{to}$  akımlarında azalmaya bağlı APD'nin uzaması gözlenmiştir. Ang (1-7)  $K^+$  kanal artışına bağlı  $I_{to}$ 'nun artmasını sağlamış ve sonuçta APD'nin uzamasını engellemiştir. Diyabet CICR mekanizmasını  $I_{CaL}$ 'nin azalması, SR içerisine  $Ca^{2+}$  alımının yavaşlaması, diyastolik  $[Ca^{2+}]_i$  artışı ve RYR'den  $Ca^{2+}$  salınımının azalmasına bağlı olarak bozmaktadır. Ang (1-7) bu değişimleri engelleyerek CICR mekanizmasını korumuştur ve PKA, CaMKII ve PKC ekspresyon seviyelerindeki değişimleri engellenmiştir. Ang (1-7) uygulaması baskılanan ACE2 aktivitesini ve seviyesini düzeltmiştir.

**Sonuç:** Ang (1-7) diyabette gerçekleşen diyastolik fonksiyon bozukluğunu ACE ve ACE2 aktivite oranını dengeleyerek engellemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabetik Kardiyomiyopati, Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi, Anjiyotensin (1-7), Elektrofizyoloji, Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi

## ABSTRACT

**Objective:** The Renin-angiotensin system (RAAS) is known to play a critical role in diabetic cardiomyopathy (DCM). Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) and Ang (1-7)/MasR axis, which are recognized as new players of this system, are thought to play a role in development of DCM. In this study, we have aimed that to observe possible effects of Ang (1-7), which has beneficial effects on cellular levels of cardiac pathologies, and its mechanisms on excitation-contraction coupling impaired in DCM.

**Method:** Ang (1-7) (600 µg/kg) was administered i.p. for 30 days to Wistar rats in which experimental diabetes model was created with STZ (50 mg/kg; single dose). ECG and left ventricular pressure-volume loops were assessed to observe the changes in organ level. At cardiomyocytes level, excitation-contraction coupling was evaluated by patch-clamp and fluorometric methods. In addition, we have been evaluated that levels of local RAAS components and proteins involved in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis to contribution on excitation-contraction coupling by using western-blot method.

**Results:** We observed decrease in cardiac efficiency by causing diabetes impaired cardiac output, stroke volume and stroke work. Diabetes prolonged relaxation period, slowed filling rate and disrupted the the left ventricular-aorta coupling by increasing arterial elastance. Ultimately, these changes lead to diastolic dysfunction in DCM, and Ang (1-7) ameliorated these changes. The prolongation of APD due to a decrease in  $I_{to}$  was observed in DCM. Ang (1-7) increased  $I_{to}$  due to increasing  $\text{K}^+$  channel proteins and consequently prevents prolongation of APD. Diabetes disrupts the CICR mechanisms due to decreased  $I_{\text{CaL}}$ , delayed  $\text{Ca}^{2+}$  intake into SR, increased diastolic  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and decreased  $\text{Ca}^{2+}$  release from RYR. Ang (1-7) protected the CICR mechanisms by improving these impairment. Ang (1-7) blocked the alteration in PKA, CaMKII and PKC function levels caused by diabetes. Ang (1-7) application improved the suppressed ACE2 activity.

**Conclusion:** Ang (1-7) prevents diastolic dysfunction in diabetes by balancing ACE and ACE2 activity ratio.

**Key words:** Diabetic Cardiomyopathy, Renin-Angiotensin-Aldosterone System, Angiotensin (1-7), Electrophysiology, Excitation-Contraction Coupling

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>ÖZET</b>                                                                                                        | i   |
| <b>ABSTRACT</b>                                                                                                    | ii  |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>                                                                                                 | iii |
| <b>TABLolar DİZİNİ</b>                                                                                             | vi  |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>                                                                                             | vii |
| <b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>                                                                                     | ix  |
| <br>                                                                                                               |     |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                                                                    | 1   |
| <br>                                                                                                               |     |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                                                                                           | 3   |
| 2.1.Kalbin Genel Yapısı ve İşlevi                                                                                  | 3   |
| 2.2.Kardiyomiyositlerde Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi                                                                | 4   |
| 2.3.Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi                                                                          | 7   |
| 2.3.1.Sistemik Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi                                                               | 7   |
| 2.3.2.Lokal Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi                                                                  | 9   |
| 2.3.3.Klasik Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi (ACE/Ang II/AT1R)                                               | 10  |
| 2.3.4.Yeni Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi (ACE2/Ang (1-7)/MasR)                                             | 14  |
| 2.4.Diabetes Mellitus                                                                                              | 24  |
| 2.4.1.Diyabetik Kardiyomiyopati                                                                                    | 25  |
| 2.5.Diyabetik Kardiyomiyopati ve Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi İlişkisi                                    | 30  |
| <br>                                                                                                               |     |
| <b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                                                                                          | 34  |
| 3.1.Deney Gruplarının Oluşturulması                                                                                | 34  |
| 3.2.Kan Basıncı Ölçümleri                                                                                          | 36  |
| 3.3.Elektrokardiyografi Ölçümleri                                                                                  | 36  |
| 3.4.Hemodinamik (Basıncı-Hacim Döngüsü) Parametrelerinin Ölçümleri                                                 | 37  |
| 3.5.Kardiyomiyosit İzolasyonu                                                                                      | 39  |
| 3.6.Aksiyon Potansiyeli Ölçümü                                                                                     | 40  |
| 3.7.Voltaja bağımlı Potasyum Kanal Akımı Ölçümü                                                                    | 41  |
| 3.8.Voltaja Bağımlı Kalsiyum Kanal Akımları ve Eş Zamanlı Hücre İçi Geçici Kalsiyum Değişimi (Transient) Ölçümleri | 42  |
| 3.9.Bazal ve Geçici Hücre İçi Kalsiyum Değişimi (Transient) Ölçümleri                                              | 43  |
| 3.10.Sodyum-Kalsiyum Değiş tokuşçusu ve Kafein İndüklü Kalsiyum Değişimi                                           |     |

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| (Transient) Ölçümü                                                                                                                                              | 43 |
| 3.11.Kontraktıl Parametre Ölçümleri                                                                                                                             | 44 |
| 3.12.Protein Tayini                                                                                                                                             | 44 |
| 3.13.Western-Blot Ölçümleri                                                                                                                                     | 45 |
| 3.14.Enzim Aktivitesi Ölçümleri                                                                                                                                 | 45 |
| 3.15.Kullanılan Kimyasallar                                                                                                                                     | 46 |
| 3.16.İstatistiksel Analiz                                                                                                                                       | 47 |
| <b>4. BULGULAR</b>                                                                                                                                              | 48 |
| 4.1.Deney Hayvanlarının Genel Durumu                                                                                                                            | 48 |
| 4.2.Diyabetik Koşulların Sistemik ve Kalp Düzeyindeki Etkileri                                                                                                  | 49 |
| 4.2.1.Diyabetin Kann Basıncı Üzerine Etkisi                                                                                                                     | 49 |
| 4.2.2.Diyabetin Kardiyak Elektriksel Aktivite Üzerine Etkisi                                                                                                    | 50 |
| 4.2.3.Diyabetik Kardiyomiyopatide Bozulan Sol Ventrikül Basınç-Hacim Dengesine Anjiyotensin 1-7 Uygulamasının Etkileri                                          | 52 |
| 4.3.Diyabetik Kardiyomiyopatinin Hücre Düzeyinde Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi Üzerine Etkileri                                                                   | 56 |
| 4.3.1.Diyabetik Kardiyomiyopati ve Anjiyotensin 1-7 Uygulamasının Kardiyomiyosit Aksiyon Potansiyeli Üzerine Etkileri                                           | 56 |
| 4.3.2.Diyabetik Kardiyomiyopati ve Anjiyotensin 1-7 Uygulamasının Voltaja Bağımlı Potasyum Kanal Akımları Üzerine Etkileri                                      | 57 |
| 4.3.3.Diyabetik Kardiyomiyopati ve Anjiyotensin 1-7 Uygulamasının Kontraktıl Parametreler Üzerine Etkileri                                                      | 60 |
| 4.3.4.Diyabetik Kardiyomiyopati ve Anjiyotensin 1-7 Uygulamasının Voltaja Bağımlı Kalsiyum Akımları ve Eş Zamanlı Kalsiyum Transientleri Üzerine Etkileri       | 61 |
| 4.3.5.Diyabetik Kardiyomiyopati ve Anjiyotensin 1-7 Uygulamasının Bazal ve Hücre İçi Geçici Transientleri Üzerine Etkileri                                      | 63 |
| 4.3.6.Diyabetik Kardiyomiyopati ve Anjiyotensin 1-7 Uygulamasının Sodyum-Kalsiyum Değiştokuşusu Akımı ve Kafein İndüklü Kalsiyum Transientleri Üzerine Etkileri | 65 |
| 4.3.7.Diyabetik Kardiyomiyopati ve Anjiyotensin 1-7 Uygulamasının Sarkoplazmik Retikulum Proteinleri Üzerine Etkileri                                           | 66 |
| 4.4.Diyabetik Kardiyomiyopati ve Anjiyotensin 1-7'nin Hücre İçi Kalsiyum                                                                                        |    |

|                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Sinyal Yolağı Üzerine Etkileri                                                                                                       | 68  |
| 4.5.Diyaetk Kardiyomiyopati ve Anjiyotensin 1-7 Uygulamasıyla Lokal<br>Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sisteminin Yeniden Düzenlenmesi | 69  |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                                                                                                   | 72  |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                                                                                                          | 84  |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                                                                                     | 88  |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                                                                      | 119 |
| <b>EKLER</b>                                                                                                                         |     |



## TABLÖLAR DİZİNİ

|                   |                                                                                     |    |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 4.1.</b> | Deney hayvanlarından elde edilen kan glukoz ve makro anatomik verileri.             | 48 |
| <b>Tablo 4.2.</b> | Deney hayvanlarından ölçülen elektrokardiyografi verileri.                          | 51 |
| <b>Tablo 4.3.</b> | Deney gruplarının hemodinamik verileri.                                             | 53 |
| <b>Tablo 4.4.</b> | Deney gruplarından elde edilen voltaja bağımlı potasyum kanal kinetikleri verileri. | 60 |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                   |                                                                                                                                                                                                            |    |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 2.1.</b> | Sol ventrikül aksiyon potansielinin ve her fazında baskın olan iyon akımlarının şematik gösterimi.                                                                                                         | 6  |
| <b>Şekil 2.2.</b> | Kardiyomiyositlerde gerçekleşen uyarılma-kasılma çiftleniminin şematik gösterimi.                                                                                                                          | 7  |
| <b>Şekil 2.3.</b> | Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi (RAAS)'nin şematik gösterimi.                                                                                                                                        | 8  |
| <b>Şekil 2.4.</b> | Yeni RAAS olarak nitelendirilen ACE2/Ang (1-7)/MasR yolağında eklenmesiyle oluşan renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi.                                                                                   | 15 |
| <b>Şekil 2.5.</b> | Anjiyotensin (1-7) /MasR yolağının sistemik olarak etki ettiği fonksiyonların şematik gösterimi.                                                                                                           | 17 |
| <b>Şekil 3.1.</b> | Oluşturulan deney gruplarının şematik gösterimi.                                                                                                                                                           | 35 |
| <b>Şekil 3.2.</b> | Elektrokardiyografi ölçüm yönteminin prensibi ve temel EKG dalgasının şematik gösterimi.                                                                                                                   | 37 |
| <b>Şekil 3.3.</b> | Basınç-hacim ölçümünün şematize gösterimi.                                                                                                                                                                 | 38 |
| <b>Şekil 3.4.</b> | Sol ventrikül basınç-hacim ilişkisinin bir döngüsü sırasında gerçekleşen durumlar ve hesaplanan parametrelerin gösterimi                                                                                   | 39 |
| <b>Şekil 4.1.</b> | Deney hayvanlarının kuyruk kan basıncı ölçüm verileri.                                                                                                                                                     | 50 |
| <b>Şekil 4.2.</b> | Deney hayvanlarında elde edilen EKG parametreleri.                                                                                                                                                         | 52 |
| <b>Şekil 4.3.</b> | Deney gruplarından elde edilen hemodinamik parametrelerin gösterimi.                                                                                                                                       | 55 |
| <b>Şekil 4.4.</b> | Deney gruplarının sol ventrikül hemodinamik verileri.                                                                                                                                                      | 56 |
| <b>Şekil 4.5.</b> | Deney gruplarından ölçülen AP parametre değerleri.                                                                                                                                                         | 57 |
| <b>Şekil 4.6.</b> | Voltaj kenetleme yöntemi kullanılarak deney gruplarından elde edilen voltaja bağımlı potasyum kanal akımı ve western-blot yöntemi ile ölçülen voltaja bağımlı potasyum kanal proteini ekspresyon verileri. | 59 |
| <b>Şekil 4.7.</b> | Kardiyomiyositlere elektriksel alan uyarımı ile elde edilen kontraktıl parametre verileri.                                                                                                                 | 61 |
| <b>Şekil 4.8.</b> | Voltaja bağımlı kalsiyum kanalı ve eş zamanlı olarak kaydedilen hücre içi kalsiyum transientlerinin gösterimi.                                                                                             | 63 |

|                    |                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.9.</b>  | Elektriksel alan uyarımı yöntemiyle elde edilen hücre içi bazal ve geçici kalsiyum transient değişimleri.                                                                                                | 64 |
| <b>Şekil 4.10.</b> | Sodyum-kalsiyum değiştokuşçusu akımı ve eş zamanlı kafein indüklükalsiyum transientleri verileri.                                                                                                        | 66 |
| <b>Şekil 4.11.</b> | Western-blot yöntemiyle elde edilen sarkoplazmik retikulum üzerinde bulunan kalsiyum düzenleyici proteinler.                                                                                             | 67 |
| <b>Şekil 4.12.</b> | Hücre içi kalsiyum düzenlenmesi ve etkin sinyal yolağının belirlenmesi                                                                                                                                   | 68 |
| <b>Şekil 4.13.</b> | Lokal renin-anjiyotensi sistemi verileri.                                                                                                                                                                | 70 |
| <b>Şekil 4.14.</b> | Lokal RAS enzim aktiviteleri.                                                                                                                                                                            | 70 |
| <b>Şekil 6.1.</b>  | Çalışmamızda elde ettiğimiz diyabetik kardiyomiyopatide bozulan uyarılma-kasılma çiftlenimi, değişen sinyal yolları ve lokal RAAS elemanları üzerine Ang (1-7)'nin etkilerinin şematik olarak gösterimi. | 85 |

## SİMGELER ve KISALTMALAR

|                                 |                                                         |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>[Ca<sup>2+</sup>]</b>        | : Hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonu             |
| <b><math>\alpha</math>SMA</b>   | : Alfa düz kas aktin                                    |
| <b>ACE</b>                      | : Anjiyotensin dönüştürücü enzim                        |
| <b>ACE2</b>                     | : Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2                      |
| <b>ADH</b>                      | : Anti diüretik hormon                                  |
| <b>AF</b>                       | : Atrial fibrilasyon                                    |
| <b>AIA</b>                      | : Antijen indüklü artrit                                |
| <b>Akt</b>                      | : Serin-treonin protein kinaz                           |
| <b>AMPK-<math>\alpha</math></b> | : 5' adenzin monofosfat aktiviteli protein kinaz alfa   |
| <b>AMPK-<math>\beta</math>1</b> | : 5' adenzin monofosfat aktiviteli protein kinaz beta 1 |
| <b>ANG</b>                      | : Anjiyotensinojen                                      |
| <b>Ang I</b>                    | : Anjiyotensin 1                                        |
| <b>Ang II</b>                   | : Anjiyotensin 2                                        |
| <b>Ang (1-7)</b>                | : Anjiyotensin 1-7                                      |
| <b>Ang 1-7</b>                  | : Anjiyotensin 1-7 grubu                                |
| <b>Ang (1-9)</b>                | : Anjiyotensin 1-9                                      |
| <b>AP1</b>                      | : Aktivatör protein 1                                   |
| <b>AP2</b>                      | : Adipoz lipit bağlı protein 2                          |
| <b>AP</b>                       | : Aksiyon Potansiyeli                                   |
| <b>APD</b>                      | : Aksiyon potansiyeli süresi                            |
| <b>APD<sub>90</sub></b>         | : Aksiyon potansiyeli süresinin %90                     |
| <b>ARB</b>                      | : Anjiyotensin reseptör blokörü                         |
| <b>ARDS</b>                     | : Akut solunum distress sendromu                        |
| <b>AT1R</b>                     | : Anjiyotensin tip 1 reseptör                           |

|                                                    |                                                    |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>AT2R</b>                                        | : Anjiyotensin tip 2 reseptör                      |
| <b>ATP</b>                                         | : Adenozin trifosfat                               |
| <b>ATPaz</b>                                       | : Adenozin trifosfataz                             |
| <b>AV</b>                                          | : Atriyovenriküler nod                             |
| <b>AVE0991</b>                                     | : Peptit olmayan anjiyotensin 1-7 reseptör agonist |
| <b>C<sub>24</sub>H<sub>39</sub>NaO<sub>4</sub></b> | : Sodyum deoksikolat                               |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b>                             | : Kalsiyum iyonu                                   |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b>                            | : Kalsiyum klorür                                  |
| <b>CaMKII</b>                                      | : Kalmodulin kinaz 2                               |
| <b>c-AMP</b>                                       | : Siklik adenozin mono fosfat                      |
| <b>CdCl<sub>2</sub></b>                            | : Kadmiyum klorür                                  |
| <b>CICR</b>                                        | : Kalsiyum indüklü kalsiyum salınımı               |
| <b>Cl<sup>-</sup></b>                              | : Klor iyonu                                       |
| <b>CO</b>                                          | : Kardiyak debisi                                  |
| <b>CO<sub>2</sub></b>                              | : Karbon dioksit                                   |
| <b>Cs</b>                                          | : Sezyum                                           |
| <b>CsCl</b>                                        | : Sezum klorür                                     |
| <b>c-Src</b>                                       | : Hücresel proto-onkogen tirozin-protein kinaz     |
| <b>CTFG</b>                                        | : Bağlayıcı doku büyüme faktörü                    |
| <b>CXCL1</b>                                       | : Komokin ligand 1                                 |
| <b>DAG</b>                                         | : Diaçil gliserol                                  |
| <b>DKM</b>                                         | : Diyabetik kardiyomiyopati grubu                  |
| <b>DKM+Ang 1-7</b>                                 | : Diyabetik kardiyomiyopati+anjiyotensin 1-7 grubu |
| <b>DM</b>                                          | : Diabetes mellitus                                |
| <b>DTT</b>                                         | : Ditiyotreitol                                    |

|                       |                                                   |
|-----------------------|---------------------------------------------------|
| <b>%EF</b>            | : % Ejeksiyon fraksiyonu                          |
| <b>Ea</b>             | : Arteriyal elastans                              |
| <b>ECC</b>            | : Uyarılma-kasılma çiftlenimi                     |
| <b>ECL</b>            | : Güçlenmiş kemilüminisans                        |
| <b>EDP</b>            | : Diyastol sonu basıncı                           |
| <b>EDTA</b>           | : Etilen diamin tetraasetik asit                  |
| <b>EDV</b>            | : Diyastol sonu hacmi                             |
| <b>EGFR</b>           | : Endotelyal büyüme faktör reseptörü              |
| <b>EGTA</b>           | : Etilen glikol tetraasetik asit                  |
| <b>EKG</b>            | : Elektrokardiyografi                             |
| <b>eNOS</b>           | : Endotelyal nitrik oksit sentaz                  |
| <b>ERK1/2</b>         | : Hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz ½           |
| <b>ESP</b>            | : Sistol sonu basıncı                             |
| <b>ESV</b>            | : Sistol sonu hacmi                               |
| <b>FKB12.6</b>        | : Peptidil prolil cis-trans izomeraz              |
| <b>GAPDH</b>          | : Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz             |
| <b>GLUT4</b>          | : Glukoz taşıyıcı tip 4                           |
| <b>GPCR</b>           | : G protein bağlı reseptör                        |
| <b>GTP</b>            | : Guanozin trifosfat                              |
| <b>GJ</b>             | : Gedik kavşak                                    |
| <b>H<sub>2</sub>O</b> | : Su                                              |
| <b>HCN</b>            | : Hiperpolarizasyon ile aktive olan katyon kanalı |
| <b>HF</b>             | : Kalp yetmezliği                                 |
| <b>HR</b>             | : Kalp hızı                                       |
| <b>Hz</b>             | : Hertz                                           |

|                                     |                                            |
|-------------------------------------|--------------------------------------------|
| <b>IA1</b>                          | : Tip I alfa 1                             |
| <b>I<sub>CaL</sub></b>              | : L-tipi kalsiyum akımı                    |
| <b>I<sub>K1</sub></b>               | : İçeri doğrultucu potasyum akımı          |
| <b>I<sub>Kr</sub></b>               | : Hızlı geçikmiş doğrultucu potasyum akımı |
| <b>I<sub>Ks</sub></b>               | : Yavaş gecikmiş doğrultucu potasyum akımı |
| <b>IL-1b</b>                        | : İnterlökin 1b                            |
| <b>IL-6</b>                         | : İnterlökin 6                             |
| <b>I<sub>Na</sub></b>               | : Sodyum akımı                             |
| <b>I<sub>NCX</sub></b>              | : Sodyum-kalsiyum değiştokuşcu akımı       |
| <b>IP3</b>                          | : İnoзитol trifosfat                       |
| <b>I<sub>to</sub></b>               | : Geçici dışa doğrultucu potasyum akımı    |
| <b>JAK</b>                          | : Janus kinaz                              |
| <b>JNK</b>                          | : C-jun n-terminal kinaz                   |
| <b>K</b>                            | : Kontrol grubu                            |
| <b>K<sup>+</sup></b>                | : Potasyum iyonu                           |
| <b>KCl</b>                          | : Potasyum klorür                          |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> | : Potasyum bifosfat                        |
| <b>kHz</b>                          | : Kilo hertz                               |
| <b>Kv4.2</b>                        | : Voltaja bağımlı 4.2 potasyum kanalı      |
| <b>L<sub>0</sub></b>                | : Sarkomer boyu                            |
| <b>L/L<sub>0</sub></b>              | : % Kısalma oranı                          |
| <b>LAD</b>                          | : Sol anterior inen coroner arter          |
| <b>LPS</b>                          | : Lipopolisakkarit                         |
| <b>LQT</b>                          | : Uzamış QT sendromu                       |
| <b>LV</b>                           | : Sol ventrikül                            |

|                                           |                                         |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>LVCC</b>                               | : Voltaja bağımlı kalsiyum kanalı       |
| <b>MΩ</b>                                 | : Mega Ohm                              |
| <b>MAPK</b>                               | : Mitojen aktiviteli protein kinaz      |
| <b>MasR</b>                               | : Mas reseptörü                         |
| <b>MCP-1</b>                              | : Monosit kemobağlayıcı protein 1       |
| <b>MgATP</b>                              | : Magnezyum adenosin trifosfat          |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b>                   | : Magnezyum klorür                      |
| <b>MgSO<sub>4</sub></b>                   | : Magnezyum sülfat                      |
| <b>MI</b>                                 | : Miyokardiyal infarktüs                |
| <b>mL</b>                                 | : Mililitre                             |
| <b>mM</b>                                 | : Milimolar                             |
| <b>MMP</b>                                | : Matriks metallo peptidaz              |
| <b>MMP-2</b>                              | : Matriks metallo peptidaz 2            |
| <b>MMP-9</b>                              | : Matriks metallo peptidaz 9            |
| <b>mRNA</b>                               | : Mesajcı ribonükleik asit              |
| <b>ms</b>                                 | : Milisaniye                            |
| <b>mTOR</b>                               | : Rapamisin'in memeli hedefleri         |
| <b>mV</b>                                 | : Milivolt                              |
| <b>NCX</b>                                | : Sodyum-kalsiyum değiş tokuşçusu       |
| <b>Na<sup>+</sup></b>                     | : Sodyum iyonu                          |
| <b>Na<sub>2</sub>ATP</b>                  | : Sodyum adenosin trifosfat             |
| <b>NaCl</b>                               | : Sodyum klorür                         |
| <b>NaF</b>                                | : Sodyum florür                         |
| <b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaz</b> | : ATPaz bağımlı sodyum-potasyum pompası |
| <b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b>       | : Sodyum orto vanadat                   |

|                      |                                                    |
|----------------------|----------------------------------------------------|
| <b>NEP</b>           | : Nötr endo peptitaz                               |
| <b>NF-κB</b>         | : Nükleer faktör kappa b                           |
| <b>NO</b>            | : Nitrik oksit                                     |
| <b>NOX</b>           | : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz    |
| <b>NOX2</b>          | : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz 2  |
| <b>O<sub>2</sub></b> | : Oksijen                                          |
| <b>p38-MAPK</b>      | : Stres uyarıcılı mitojen aktiviteli protein kinaz |
| <b>pA</b>            | : Piko amper                                       |
| <b>pCaMKII</b>       | : Fosforile kalmodulin kinaz                       |
| <b>PE</b>            | : Potansiyel enerji                                |
| <b>pF</b>            | : Pikofarat                                        |
| <b>PI3K</b>          | : Fosfotidil inositol 3 kinaz                      |
| <b>PIP2</b>          | : Fosfotidil inositol bifosfat                     |
| <b>PKA</b>           | : Protein kinaz A                                  |
| <b>PKC</b>           | : Protein kinaz C                                  |
| <b>PLB</b>           | : Fosfolamban                                      |
| <b>PLC</b>           | : Fosfolipaz C                                     |
| <b>Pmax</b>          | : Maksimum basınç                                  |
| <b>PMSF</b>          | : Fenilmetilsülfonil florit                        |
| <b>POP</b>           | : Prolil endo peptidaz                             |
| <b>PPAR</b>          | : Peroksizom çoğaltıcı-aktiviteli reseptör         |
| <b>pPKA</b>          | : Fosforile protein kinaz A                        |
| <b>pPLB</b>          | : Fosforile fosfolamban                            |
| <b>pRyR</b>          | : Fosforile riyanodin reseptörü                    |
| <b>PVA</b>           | : Basınç-hacim ilişkisi                            |

|                 |                                                                  |
|-----------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>P-V Loop</b> | : Basınç-hacim döngüsü                                           |
| <b>QTc</b>      | : Düzeltilmiş QT                                                 |
| <b>RAAS</b>     | : Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi                          |
| <b>rhACE2</b>   | : Rekombinant insan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2             |
| <b>RhoA</b>     | : Ras homolog aile üyesi A                                       |
| <b>RMP</b>      | : Dinlenim zar potansiyeli                                       |
| <b>ROS</b>      | : Reaktif oksijen türleri                                        |
| <b>RYR</b>      | : Riyanodin reseptörü                                            |
| <b>RYR2</b>     | : Riyanodin reseptörü 2                                          |
| <b>SA</b>       | : Sinoatriyal nod                                                |
| <b>SERCA2a</b>  | : Sarkoplazmik retikulum kalsiyum adenozin trifosfataz           |
| <b>SF</b>       | : Serum fizyolojik                                               |
| <b>SHR</b>      | : Spontan hipertansif rat                                        |
| <b>SR</b>       | : Sarkoplazmik retikulum                                         |
| <b>STATs</b>    | : Transkripsiyon proteinlerinin aktive edici ve çevirici sinyali |
| <b>STZ</b>      | : Streptozotozin                                                 |
| <b>SV</b>       | : Atım hacmi                                                     |
| <b>SW</b>       | : Atım işi                                                       |
| <b>T1DM</b>     | : Tip 1 diyabet                                                  |
| <b>T2DM</b>     | : Tip 2 diyabet                                                  |
| <b>TGF-β</b>    | : Dönüşmüş büyüme faktörü beta                                   |
| <b>TNF-α</b>    | : Tümör nekrozis faktör alfa                                     |
| <b>TOP</b>      | : Timepin oligo peptidaz                                         |
| <b>TP</b>       | : Tepeye çıkış süresi                                            |

|                        |                                            |
|------------------------|--------------------------------------------|
| <b>TRIS-HCl</b>        | : Hidroksimetil aminometan hidrojen klorür |
| <b>TTBS</b>            | : Tween tris-tamponlu tuz                  |
| <b>V</b>               | : Volt                                     |
| <b>VEGF</b>            | : Vasküler endotelyal büyüme faktörü       |
| <b>VEGF-D</b>          | : Vasküler endotelyal büyüme faktörü D     |
| <b>V<sub>max</sub></b> | : Maksimum hacim                           |
| <b>V<sub>min</sub></b> | : Minimum hacim                            |
| <b>µg</b>              | : Mikrogram                                |
| <b>τ</b>               | : Tau                                      |

## 1. GİRİŞ

Diyabetik kardiyomiyopati (DKM) belirgin bir koroner hastalık bulgusu olmadan gelişen diyabet komplikasyonu olarak tanımlanır (Rubler ve ark., 1972). DKM organ düzeyinde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişimlerin temelini, hücre metabolizmasının bozulması, oksidatif stresin uyarılması, ekstraselüler matriks içeriğinin değişimi ve fibrozis oluşumu, uyarılma-kasılma çiftlenimi değişiklikleri, insülin sinyalinin bozulması, hücre zarı ve hücre içerisindeki düzenleyici sinyal yollarının farklılaşması oluşturmaktadır. Renin-Angiotensin-Aldesteron Sistemi (RAAS) geçtiğimiz on yıl içerisinde klinik ve deneysel gözlemlerle revize edilmiş saf bir endokrin sistemdir. Güncel olarak iki ayakta oluşmaktadır. İlk ayak olarak adlandırdığımız kısım klasik RAAS'dır. Klasik RAAS etkisini anjiyotensin II (Ang II) üzerinden, hücre zarında bulunan Ang II tip 1 reseptörü (AT1R) ve Ang II tip 2 reseptörü (AT2R) üzerinden göstermektedir. AT1R G-proteini aracılığıyla hücre içi sinyal yollarını etkilemektedir (de Gasparo 2000; Berry ve ark., 2001; Kaschina ve ark., 2003). Sinyal iletimi sonucunda hipertrofi, inflamasyon, fibrozis, apoptozis ve oksidatif stres yolları aktive edilir (Gallinat ve ark., 2000; Welch 2008). RAAS'a olan geleneksel bakış açısı büyük ölçüde, ACE2 enziminin keşfedilmesinin ardından önemli değişiklikler geçirmiştir (Donoghue ve ark., 2000; Harmer ve ark., 2002; Vickers ve ark., 2002). İkinci ayak olarak nitelendirilen ve klasik RAAS'ın etkilerini dengeleyici yönde fonksiyonlar gerçekleştiren yeni RAAS, ACE2/Ang (1-7)/MasR yolağı üzerinden etkilerini ortaya çıkarmaktadır. ACE2, anjiyotensin I (Ang I) ve Ang II'den gelen C terminali rezidülerini parçalar, böylece Ang II düzeylerini düşürür ve anjiyotensin (1-9) (Ang (1-9)) veya anjiyotensin (1-7) (Ang (1-7)) üretir (Donoghue ve ark., 2000). Ang II yanında en etkili RAAS elemanı Ang (1-7) olduğu gösterilmiştir. Ang (1-7) etkisini hücre düzeyinde G-proteini ilişkili Mas reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Rowe ve ark., 1995; Santos ve ark., 2003). Diyabetik durumda hiperglisemi artışına bağlı olarak klasik RAAS'ta Ang II artışının DKM'nin oluşumu ve ilerlemesinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu artışı takiben AT1R aktivite artışı sonucunda fibrozis artmakta (Westermann ve ark., 2007a; Lee ve ark., 2014), inflamasyonda ve ROS üretiminde artış ile birlikte uyarı iletiminde bozulma ve kardiyak metabolizmada farklılaşmalar meydana gelmektedir (Dandona ve ark.,

2003). Hücre düzeyinde, Ang II/AT1R aktivitesindeki artış sonucunda DKM’de aksiyon potansiyeli repolarizasyon (APD) süresinde uzama gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmalara göre bu durumun başlıca nedeni geçici dışa doğru ( $I_{to}$ ) ve içe doğrultucu ( $I_{K1}$ )  $K^+$  akımlarının üzerinde oluşan baskılanmadır (Raimondi ve ark., 2004). DKM’de uyarılmaya etki edebilen Ang II/AT1R sinyal iletimi, kasılma fonksiyonunu da değiştirmektedir. Bozulan kasılma fonksiyonunun nedeni olarak Ang II/AT1R sinyalinin hücre içi  $Ca^{2+}$  düzenlenmesini etkilediği bulgusuna ulaşılmıştır (Malhotra ve ark., 1997). Özellikle ryanodin reseptörü (RyR) ve FKBP12.6 proteinlerini PKC aracılığıyla etkileyerek, sarkoplazmik retikulum (SR)  $Ca^{2+}$  içeriği,  $Ca^{2+}$  transientleri ve sızıntılar üzerine etki göstermektedir (Yaras ve ark., 2007). Ang (1-7)’nin sistemik ve kardiyak doku üzerine olan yararlı etkileri göz önüne alındığında, patolojik süreçlerde yararlı etkilere sahip olduğu söylenebilmektedir. Ang II’ye bağlı fonksiyonları engelleyebildiğinin açıkça ortaya konmasından dolayı, DKM olgusu üzerine olası etkileri merak konusu haline gelmiştir. DKM’den müzdarip hastalarda sol ventrikül yeniden modellenmesi ve fonksiyon bozukluğuyla, plazmadaki Ang (1-7) konsantrasyonu arasında negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir (Hao ve ark., 2013). Ang (1-7) uygulamasının DKM’ye bağlı oluşan hipertofiyi, lipotoksisteyi, adipoz dokuda gözlenen inflamasyonu engellediği ve diyastolik fonksiyon bozukluğunu geriletebildiği (Mori ve ark., 2014), ayrıca DKM kaynaklı akciğer inflamasyonunu da baskıladığı gösterilmiştir (Papinska ve ark., 2016). Ang (1-7) uygulaması metabolik döngüyü toparlamış ve DKM ile ortaya çıkan vazokonstriktif, fibrotik ve proliferatif özellikleri de geriletebilmiştir (Singh ve ark., 2011). Dolayısıyla bu olgularda gerileme ve oluşan sol ventrikül yeniden modellenmesi ve fonksiyon bozukluğunda iyileşme sonuçları ortaya çıkmaktadır (Hao ve ark., 2015). Klasik RAAS’ın patolojik koşullarda etkin rol oynaması kardiyak patolojilerin değerlendirilme sürecinde dikkat edilmesi gereken hususlar ortaya koymaktadır. Yapılan çalışmalar yeni RAAS’ın yararlı etkilerini belirtmiş ve tıropatik etkilerini ön plana çıkarmıştır. Çalışmamız Ang (1-7) molekülünün DKM’de uyarılma-kasılma çiftlenimi üzerine olan etkisini, olası etkinin hangi mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştiğini cevaplamak amacıyla tasarlanmış ve DKM’nin tedavi süreçlerinde ACE2/Ang (1-7)/MasR aksının rolünü sorgulayarak, mekanizmanın detaylı bir şekilde ortaya koyulmasını amaçlamaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Evrimsel basamaklarda yukarıya çıktıkça canlıların organ sistemleri gelişti, birbirleriyle etkileşimi arttı ve çok daha karmaşık bir yapı haline dönüştüler. Üst düzey omurgalılar için sindirilme sonucu hücrelerin kullanabileceği temel besin bileşenlerinden, hücresel solunum için kullanılacak moleküler O<sub>2</sub>'ye kadar birçok molekülün ilgili organlardan bu çok gelişmiş ve büyümüş yapı içerisinde ihtiyaç duyulduğu yere ulaştırılması gerekmektedir. Evrimsel sürecin ilerlemesiyle bu sorun dolaşım sisteminin gelişmesiyle çözüme ulaşabildi. Kardiyovasküler sistem olarak adlandırılan bu yapı, temel olarak organların kanlanması, bu sayede fonksiyonlarını yerine getirebilmek için gerekli moleküllerin taşınmasını ve uzaklaştırılmasını gerçekleştiren ve bu durumun sürekliliğini sağlayan yapı olarak nitelendirilebilir. Bu yapı iki temel kolon üzerine inşa edilmiştir. Bunlardan ilki vasküler sistemdir. Vasküler sistem bu taşıma sisteminin boru hatlarıdır. Canlı organizmanın en uca köşelerine kadar uzanabilen bu yapı sayesinde organ sistemlerinin ihtiyaçları karşılanabilmekte ve birbirleri ile etkileşim içerisinde olabilmektedirler. Bu sistemin ikinci ayağı ise kalptir. Kalp bu sistemin makine dairesidir. Vasküler sistemin dolayısıyla da bu döngünün sürekliliği kalbin aralıksız çalışması sayesinde gerçekleşmektedir.

### 2.1. Kalbin Genel Yapısı ve İşlevi

Kardiyovasküler sistemin parçası olan kalp sternumun orta hattının arkasına yerleşmiştir. Gövdesinin 2/3'ü vücudun orta hattının sol tarafında olacak şekilde yan yatmış pozisyonda bulunmaktadır. Apeksi öne, aşağıya ve sol tarafa uzanmış bir pozisyonda 5. interkostal aralıkta bulunmaktadır. Kalbin en üst ucu yukarıya, arkaya, sağa doğru uzanacak biçimde yerleşmiş ve 2. kostanın alt bölümüne kadar ulaşabilmektedir. Büyük damarlarla bağlantılı olan üst kısmı apekse nazaran sabitlenmiş bir pozisyonundadır. Kalp göğüs boşluğunda perikard adını alan bir zar içinde bulunmaktadır. Perikard iki kısımdan oluşmaktadır. Bunlar fibröz ve seröz perikarddır. Seröz perikard da pariyetal ve viseral perikard olmak üzere iki kısımdan meydana gelmektedir. Kalp duvarının dış tarafını oluşturan viseral perikarda epikard denilmektedir. Epikard dışında kalp duvarını oluşturan iki tabaka daha bulunmaktadır. Bunlardan ilki miyokarddır ve kas tabakasının bulunduğu katmandır.

Diğeri ise endokarddır ve kalp duvarı ile kapakların iç yüzeyini örten ince bir fibröz tabakadır.

Kalp yukarıdan aşağıya doğru septum olarak adlandırılmış bir kas tabakası tarafından sağ ve sol olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Her iki tarafta da üstte atriyum, altta ise ventrikül olarak adlandırılan odacıklar bulunmaktadır. Sağ tarafta triküspit, sol tarafta ise biküspit atriyoventriküler kapak bulunmaktadır ve bu kapaklar kanın ventriküllerden atriyumlara kaçışını engelleyecek şekilde evrimleşmişlerdir. Sağ atriyum *Superior Vena Cava* ve *Inferior Vena Cava*, sağ ventrikül *Arteria Pulmonaris*, sol atriyum *Vena Pulmonalis* ve sol ventrikül de *Aorta Ascendens* ile bağlantılı durumdadır.

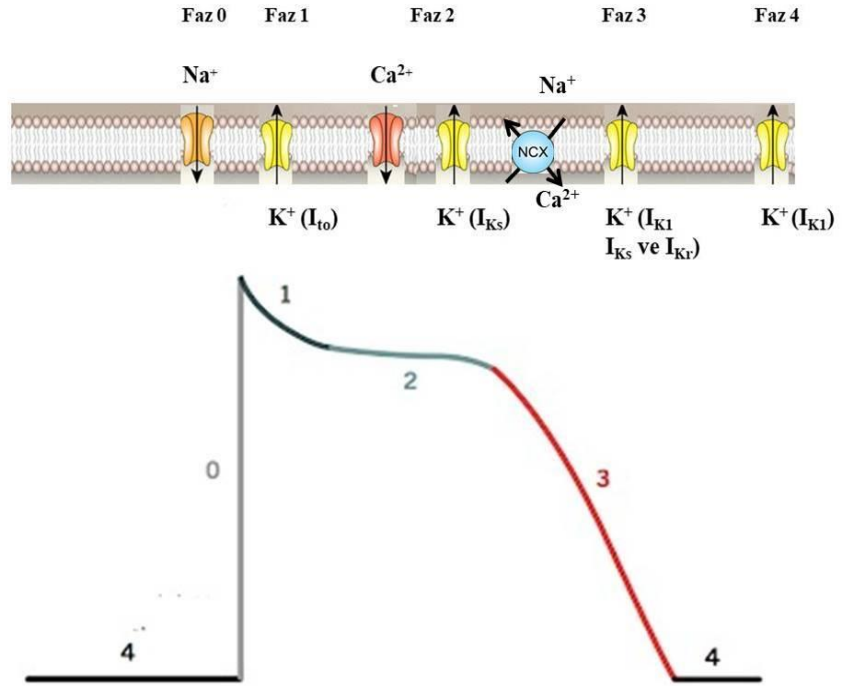
Kalbin uyarı ve ileti sistemi sağ atriyumun süperiyor ve posteriyorunda bulunan özelleşmiş bir hücre grubunu içeren sinoatriyal nodda (SA) başlar. Hiperpolarizasyon ile aktive olan katyon kanallarının (HCN) aktive olmasına bağlı olarak ilk ateşleme gerçekleşir. Burada oluşan uyarı sağ atriyum boyunca yayılarak sol atriyum ve interventriküler septumun tepesinde bulunan atriyoventriküler düğümüne (AV) ulaşır. Uyarı AV'den bağlantılı his demetlerine, his demetinin dalları olan ventrikül fasiküllerine ve son olarak purkinje liflerine iletilir. Purkinje liflerinin dalları ise ventrikül miyokard hücreleri ile bağlantılıdır. Ventriküler miyokard hücrelerine ulaşan uyarı kontraksiyonu başlatır. Kontraksiyon kalbin temel işlevi olan Frank-Starling yasasına uygun olarak venöz dönüş ile kalbe geri dönen kan hacmi kadar kanın vücuda pompalanmasını sağlamaktadır.

## **2.2. Kardiyomiyositlerde Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi**

Kardiyak fonksiyonu hücre düzeyinde en iyi açıklayan olgu uyarılma-kasılma çiftlenimidir. Kardiyomiyositleri saran hücre zarının (sarkolemma) depolarizasyonu ile başlayan ve kalbin kasılmasına kadar süren olaylar zincirine uyarılma-kasılma çiftlenimi (excitation-contraction coupling (ECC)) adı verilir. Kalp kasının kasılması diğer uyarılabilir hücrelerde de olduğu gibi hücre zarlarının depolarizasyonu ya da bir başka ifade ile aksiyon potansiyeli (AP) oluşumuyla tetiklenir. Hücrelerin birbiriyle elektriksel olarak bağlantılı (gedik kavşak aracılığı ile) olmalarından dolayı oluşan AP bir hücreden diğerine geçer. Böylece, başlangıçta bir hücrenin uyarılması diğer bütün hücrelerin uyarılmasıyla sonuçlanır. AP oluşmasının altında zarın iyon geçirgenliklerindeki değişimler yatmaktadır. Dinlenme

durumunda hücre zarı  $K^+$  daha geçirgen olduğu için dinlenme zar potansiyeli  $K^+$  denge potansiyeline (Nerst Potansiyeli) yakın bir değerdedir.

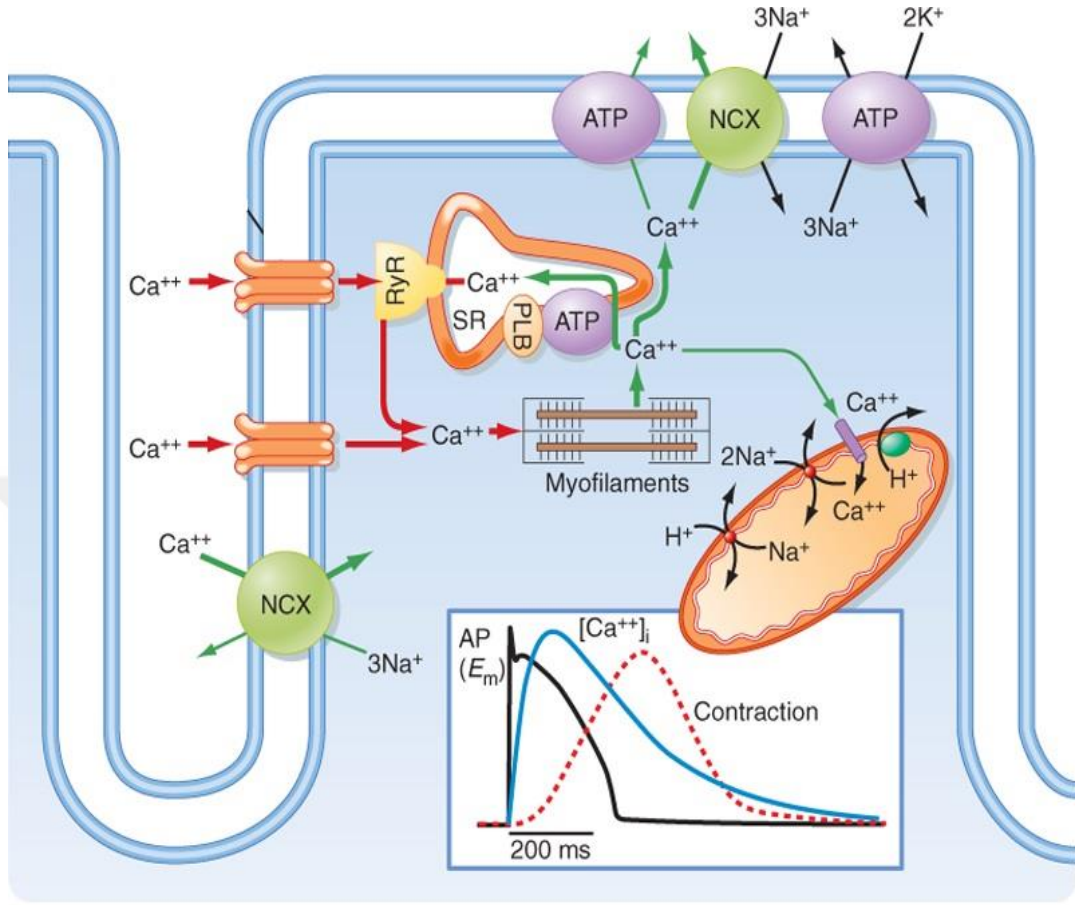
Ventriküler AP'nin konfigürasyonu 5 faza bölünebilir. Faz 0 AP'nin sıçrama evresi; faz 1 erken repolarizasyon evresi; faz 2 plato evresi; faz 3 asıl repolarizasyon evresi ve faz 4 dinlenme potansiyeli evresidir. AP'nin  $Na^+$  akımlarına bağlı olan hızlı sıçrama süreci faz 0 evresidir. Bu akımın hızlı aktivasyon ve inaktivasyon kinetikleri vardır. 1 ms'de tepe değerine ulaştıktan sonra kendiliğinden azalır (inaktivasyon). Ufak bir depolarizasyonla  $Na^+$  kanalları açılmaya başladığında, elektrokimyasal gradiyentten dolayı  $Na^+$  hücre içine girmeye başlar. Bu durum hücrenin daha fazla depolarize olmasına ve depolarize oldukça da yeni  $Na^+$  kanallarının açılmasına neden olur (Hodgkin çevrimi). AP'nin çıkışını takip eden geçici ve bağlı olarak küçük repolarizasyon faz 1 evresidir. Büyük oranda depolarizasyonla hızla açılan bir tip  $K^+$  kanalının geçici dışarı doğru (transient outward ( $I_{to}$ )) akımına bağlıdır. Daha az olmakla birlikte  $Cl^-$  akımının da katkısı vardır. Plato evresi olarak bilinen faz erken repolarizasyon fazını takip eden ve zar potansiyelinin görece sabit olduğu süreci, yani faz 2 evresini kapsar. Kalp kası hücrelerinde görülen uzun AP'nin nedenidir. Platonun nedeni içeri doğru pozitif akımların dışarı doğru pozitif akımları neredeyse dengelemesidir. L-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarından (LCC) içeri doğru  $Ca^{2+}$  girişine karşılık, yavaş aktive olan  $K^+$  (gecikmiş doğrultucu akım ( $I_{Ks}$ )) kanallarından  $K^+$  dışarı çıkar. Buna ek olarak,  $I_{to}$ 'da platonun erken evresine katkıda bulunmaktadır. Platoyu takip eden evre asıl repolarizasyon, yani faz 3 evresidir. İnaktivasyon nedeniyle  $Ca^{2+}$  kanal akımı ( $I_{Ca}$ ) zamanla azalırken, yavaş aktive olan  $I_K$  artar ve baskın hale gelir. Ventrikül hücrelerinde 4.faz dinlenme potansiyelidir. Zar  $K^+$  iyonlarına yüksek geçirgenlik gösterdiğinden  $K^+$  denge potansiyeline yakın bir değer almaktadır. Dinlenme potansiyeli büyük oranda içeri doğrultucu da denen bir tip  $K^+$  akımı ( $I_{K1}$ ) tarafından belirlenmektedir (Şekil 2.1.). Ayrıca, AP'ye katkıda bulunan pompalar da bulunmaktadır. Küçük bir akım oluşturmakla birlikte elektrojenik olan  $Na^+/K^+$  pompasının asıl işlevi akım üretmekten çok AP'yi oluşturacak iyonik gradiyentleri korumaktır. Diğer yandan, hücre zarında bulunan ve elektrojenik olarak çalışan ve  $Na^+$  gradiyentini kullanarak  $Ca^{2+}$ 'yı yokuş yukarı taşıyan  $Na^+/Ca^{2+}$  değiştokuşçusu (NCX) normal modunda dışarı attığı her  $Ca^{2+}$  için içeri 3  $Na^+$  taşıırken, plato evresinin başlangıcında ters yönde çalışarak önemli bir  $Ca^{2+}$  akımı oluşturmaktadır. Bu yüzden, NCX'in AP'nin şekline de etkisi olduğu ileri sürülmektedir (Bers 2002).



**Şekil 2.1.** Sol ventrikül aksiyon potansielinin ve her fazında baskın olan iyon akımlarının şematik gösterimi.

Kardiyak hücre zarının depolarizasyonu sonucu açılan LCC'nin aracılığıyla hücre içine  $\text{Ca}^{2+}$  girişi başlar. Küçük miktardaki bu  $\text{Ca}^{2+}$  akışı SR'ın yüzeyindeki RYR'den çok daha büyük bir  $\text{Ca}^{2+}$  salımına yol açar. Sarkoplazmik retikulum aktivasyonunun ve  $\text{Ca}^{2+}$  salımının ardından, depolarizasyondan sonraki 20-40 ms'lik süreçte hücre içi serbest  $\text{Ca}^{2+}$  konsantrasyonunda ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 100 nM olan diastolik seviyeden, 1  $\mu\text{M}$ 'lık sistolik seviyeye ani bir artış gerçekleşir. Genellikle, SR'dan  $\text{Ca}^{2+}$  salımının temel mekanizması kabul edilen bu olaya " $\text{Ca}^{2+}$  uyarımlı  $\text{Ca}^{2+}$  salımı" (CICR) denir. Kasılma işi,  $\text{Ca}^{2+}$ 'un troponin C'ye bağlanıp kontraktıl makine adı verilen aktin-miyozin-tropomiyozin kompleksini harekete geçirmesiyle başlar. Kısaca, troponin C- $\text{Ca}^{2+}$  kompleksi tropomiyozin ile etkileşerek aktin ve miyozin miyofilamentleri arasındaki aktif bölgelerin açığa çıkmasını ve çapraz köprülerin oluşmasını sağlar. Böylece, sarkomer boyu kısalır ve kasılma gerçekleşir.  $\text{Ca}^{2+}$ 'un SR  $\text{Ca}^{2+}$  pompası (SERCA2a) aracılığıyla SR içine geri alınması,  $\text{Ca}^{2+}$  pompası ve NCX ile hücre dışına atılmasıyla hücrede  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dinlenme seviyesine düşer. Bu sırada  $\text{Ca}^{2+}$  troponin

C'den ayrılır (kasın gevşeme süreci) ve kas başlangıçtaki dinlenme durumuna geri döner (Bers 2002).



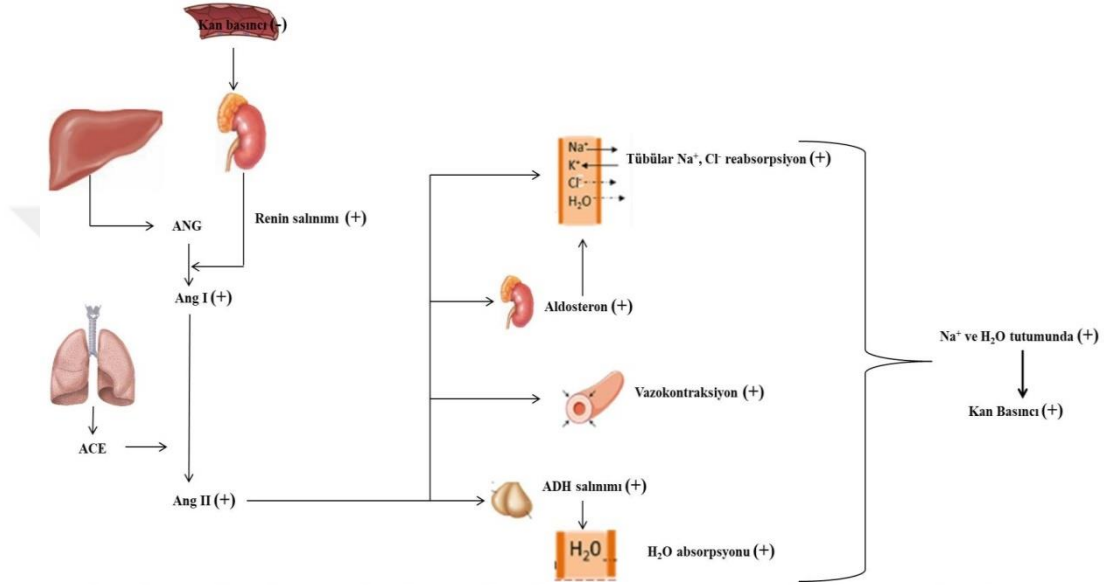
**Şekil 2.2.** Kardiyomiyositlerde gerçekleşen uyarılma-kasılma çiftleniminin şematik gösterimi (Bers 2002). Şekil hücre zarında meydana gelen geçirgenlik değişimleri sonucunda voltaja bağımlı iyon kanallarının ve pompaların devreye girmesiyle meydana gelen aksiyon potansiyelini ve buna bağlı olarak gerçekleşen kardiyak hücre içi  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 'un ve kontraksiyonun zamana göre değişimini şematize etmektedir.

### 2.3. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi

#### 2.3.1 Sistemik Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi

RAAS nörohormonal bir kontrol sistemidir. Bu nedenden dolayı kardiyovasküler fizyolojinin önemli bir bileşenidir ve damar tonusu, kan basıncı ve elektrolit dengesinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. Ancak, RAAS'da gerçekleşen düzensizlikler sonucunda hipertansiyon, çeşitli kalp yetmezlikleri, miyokard enfarktüsü, inme ve böbrek yetmezlikleri gibi kardiyovasküler/renal patolojiler de gelişebilmektedir. Renal hipoperfüzyon, azalmış  $\text{Na}^+$  konsantrasyonu ve sempatik aktivasyon artışı sonucunda baro reseptörlerin uyarılmasıyla ilk RAAS sinyalinin oluşması sağlanır. Bu değişime bağlı olarak böbrek jukstaglomerular hücreleri

tarafından bir aspartil proteaz olan renin dolaşıma salınarak, hepatik bir peptit olan anjiyotensinojeni (Agt) parçalayıp Ang I üretilmesini sağlamaktadır. İkinci aşamada, karboksi peptidaz olan ve akciğerden salınan anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) Ang I'i hidroliz ederek Ang II oktapeptitini üretir (Şekil 2.3.). Biyolojik açıdan aktif olan bu peptit, G proteini bağlı reseptör ailesinin birer üyesi olan AT1R ve AT2R reseptörleri üzerinden etkisini göstermektedir (de Gasparo 2000).



**Şekil 2.3.** Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi (RAAS)'nin şematik gösterimi. + bir molekülün konsantrasyonunun ya da bir fonksiyonun düzeyinin arttığını vurgulamaktadır. - bir molekülün konsantrasyonunun ya da bir fonksiyonun düzeyinin azaldığını vurgulamaktadır. ACE: anjiyotensin dönüştürücü enzim, ANG: anjiyotensinojen, Ang I: anjiyotensin I, Ang II: anjiyotensin II, ADH: anti diüretik hormon.

RAAS'ın başlangıçta belirli bir dokuya lokalize olmayan sistemik bir olgu olarak işlev gördüğü düşünülmekteydi. Bununla birlikte, sistemik RAAS kavramı kalp, böbrek, damar sistemi, pankreas, retina ve beyin gibi dokularında dahil olduğu birçok dokuda RAAS'ın anahtar bileşenlerinin sentezlenebildiğinin gözlemlenmesiyle değişmeye başladı (Paul ve ark., 1993; Danserve ark., 1994; De Mello ve Danser, 2000; Paul ve ark., 2006). Otokrin, parakrin veya endokrin etkileri olan ve bu etkileri sistemik RAAS içerisinde gösteren peptitlerin, doku seviyesinde de üretebildiğinin gösterilmesiyle lokal RAAS kavramı oluştu (Paul ve ark., 2006; Ribeiro-Oliveira ve ark., 2008). Dolayısıyla sistemik RAAS'ın fonksiyonlarının dışında etkilere sahip bir sistemin daha var olabileceği görüşü oluşmaya başladı.

### 2.3.2. Lokal Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi

RAAS kavramı geçtiğimiz on yıl içerisinde klinik ve deneysel gözlemlerle revize edilmiştir. ACE inhibitörleri ve AT1R antagonistleri gibi RAAS'ı hedefleyen ilaçlar kendi antihipertansif etkilerinden bağımsız olarak, kardiyovasküler organları hipertansiyon ya da diyabet hasarından etkili bir şekilde koruduğu öne sürülmüştür. Üstelik ACE inhibitörlerinin antihipertansif etkisi dolaşımdaki Ang II oluşumunu bloklama kapasiteleri ile bağdaş değildir. Hipertansif hastalara uygulanan bir kaç haftalık ACE inhibitörü tedavisi sonrasında plazma Ang II seviyelerinin normal düzeyine dönmesine rağmen, kan basıncı düzeyinin düşük seviyede kaldığı gözlenmiştir (Farquharson and Struthers 2002). Bu gözlem için olası bir açıklama olarak, bu peptitin öncüllerinin yada sentezleyici enzimlerinin plazmadan alınarak ya da böbrek, damar, kalp ve beyin gibi organlarda lokal üretimi sayesinde Ang II'nin sentezlenebileceği öne sürülmüştür. Renin ile alakalı net bir tutum olmasa da, diğer RAAS elemanları kardiyak dokuda sentezlenebilmektedir (Dostal and Baker 1999, Krop and Danser 2008). Komponentlerinin kaynağı netleştirilemese de, kalpteki Ang II'nin çoğu kardiyak dokuda sentezlenmektedir (van Kats, Danser et al. 1998). Deneysel olarak renin salınımının azaltılması için nefroktomi uygulaması kabul gören bir yöntemdir. Nefroktomi sonucunda deney hayvanları üzerine yapılan bir çalışmada nefroktomi öncesi ve sonrası plazma renin ve Ang II düzeyi ile kardiyak renin ve Ang II düzeyinde korelasyon fark edilmiştir. Bu durumun sonucunda plazmadaki reninin kardiyak dokudaki Ang II üretimine katkı sağladığı varsayımına ulaşılmıştır (Campbell ve ark., 1993; Danser ve ark., 1999). Bununla birlikte, miyokardiyal infarktüs ve kalp yetmezliği gibi durumlarda kardiyak Ang II konsantrasyonunun arttığı bildirilmiştir (Clausmeyer ve ark., 2000; Sernerı ve ark., 2001). Dolaşım ve kardiyak dokudaki Ang II düzeylerinin farklı olduğu bir başka patofizyolojik durum da diyabet patolojisinde görülmektedir. Bu durum dolaşım içerisindeki renin düzeyinin diyabetik koşullar sonucunda azalmasından dolayı kaynaklandığı bilinmektedir (Giacchetti ve ark., 2005; Sica ve Ichihara, 2006). Bu durumun aksine, kardiyak RAAS aktivitesinin diyabetik koşullarda artış gösterdiği belgelenmiştir (Singh ve ark., 2008a). Bu gözlem RAAS bileşenlerinin lokal kaynaklardan da sağlanabileceğine destek vermektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda RAAS elemanlarının dokularda özerk olarak düzenlendiği ve ilgili organlar için de önemli fonksiyonlara ve patofizyolojik etkilere sahip olduğu

düşüncesi güçlenerek artmaktadır. Sonuç olarak sistemik RAAS ve etkilerinden bağımsız bir lokal RAAS kavramından söz edilmektedir (Paul ve ark., 2006; Bader ve Ganten, 2008).

### **2.3.3. Klasik Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistem (ACE/Ang II/AT1R)**

Klasik RAAS'ın etkisinin gerçekleştirilmesini sağlayan ve bu sistemin merkez oyun kurucusu olan molekül Ang II'dir. Ang II etkisini hücre zarı üzerinde bulunan AT1R ve AT2R üzerinden göstermektedir. Temelde AT1R etkisi, G-proteini ve fosfolipaz aktivasyonu ile başlayıp ardından hücre içi inozitol trifosfat (IP3) ve  $Ca^{2+}$  artışının izlediği çoklu hücre içi sinyal yollarının aracılık etmesi ile gerçekleşmektedir (de Gasparo 2000, Berry, Touyz et al. 2001, Kaschina and Unger 2003). Sinyal iletimi protein kinaz C (PKC), Ras ve RhoA gibi küçük guanozin trifosfat (GTP) bağlayıcı proteinler ve tirozin kinaz yollarını amplifiye ederek gerçekleştirmekte ve hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz 1/2 (ERK1/2) ve p38 mitojen aktiviteli protein kinaz (p38-MAPK) ailesi ve janus kinaz-transkripsiyon proteinlerinin aktivatör ve çevirici sinyali (JAK-STAT) yollarını düzenleyerek etkilemektedir. Sonuç olarak, aktivatör protein 1 (AP1), nükleer faktör kabba B (NF- $\kappa$ B) ve STATs gibi transkripsiyon faktörleri aktive edilir ve büyümeyle ilişkili genlerin ekspresyonu başlatılır. Ayrıca, rapamisin mekanistik hedefi (mTOR/S6) yolu ve dolayısıyla proteinlerinin sentezi artar. Bununla birlikte, Ang II çeşitli hücre tiplerinde nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz aktivasyonu ile reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini ortaya çıkarır bu da epitelyal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve mineralkortikoid reseptörü (MR) gibi diğer reseptörleri transaktive eder (Gallinat ve ark., 2000; Welch, 2008).

Ang II'nin intrakrin yönü, sentezi ve muhtemel yeni hücre içi reseptörleri ile etki mekanizmalarının konumu ve modu açısından, endokrin ve otokrin/parakrin sistemlerinden önemli ölçüde farklıdır ve bu durum RAAS'a benzersiz bir boyut katmaktadır (Kumar ve ark., 2012a; Kumar ve ark., 2012b). RAAS bileşenlerinin dokuya spesifik genetik modellerini ve diğer deneysel tasarımlarını kullanarak, yerel RAAS'ın dolaşımdaki RAAS'a nazaran patolojilerde çok daha büyük bir role sahip olduğu anlaşılmıştır (Kumar ve ark., 2008; Kumar ve ark., 2009). Bu bilginin yanında renin hakkında tam bir fikir birliğine varılamamasına rağmen, klasik RAAS'ın tüm önemli bileşenlerinin kalpte ifade edilebilmesi (van Kats ve ark., 1998;

Dostal ve Baker, 1999; Krop ve Danser, 2008) ve farklı kardiyak patoloji durumlarında lokal Ang II seviyelerinin artması (Clausmeyer ve ark., 2000; Serner ve ark., 2001) lokal RAAS'ın üzerine dikkatli bir şekilde eğilme gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ancak kardiyak patolojilerde intrakrin-intraselüler ya da ekstraselüler kaynaklardan hangisinin daha etkin olduğunun anlaşılamaması, klasik RAAS ile ilişki içerisinde olan kardiyak patolojilere karşı yaklaşım şeklinin ve derecesinin belirlenememesinde önemli bir yer kapsamaktadır.

Yapısal olarak kalp dokusunu patolojik açıdan incelememiz gerektiğinde ilk değerlendirmemiz gereken parametrelerden bir tanesi hücre ya da doku ekseninde bir hipertrofinin ya da fibrozisin oluşup oluşmadığıdır. Kültüre alınmış kardiyomiyosit ve kardiyak fibroblastlarda Ang II uygulaması sonucunda hücresel hipertrofi geliştiği gözlenmiştir (Shivakumar ve ark., 2003). Ancak in vivo koşullarda bu etkiyi gözlemlemek daha zorlayıcıdır. Ang II uygulamasının sistemik etkilerde (kan basıncı gibi) değişiklikler oluşturmada kardiyak hipertrofi ve fibrozisin oluşabilme olasılığının az olduğu bazı araştırmacılar tarafından ortaya atılmıştır (Reudelhuber ve ark., 2007). Yine de literatürde transjenik hayvanlarda kan basıncı gibi sistemik etkilerden bağımsız olarak kardiyak hipertrofinin oluşması lokal RAAS aktivitesi sağlanarak gerçekleştirilebilmiştir (Mazzolai ve ark., 1998; Baker ve ark., 2004). Bu durumun Ang II'nin tekil etkisinin dışında kardiyak patolojilerde etkisi olan oksidatif stres, inflamasyon gibi ikincil etmenler ile birlikte etkisini gerçekleştirebildiği düşüncesini dile getirmektedir (Kurdi ve Booz 2011a; Kurdi ve Booz 2011b). Spontan hipertansif ratlarda yapılan çalışmada yüksek kan basıncı değişikliği, bozulmuş sol ventrikül fonksiyonu ile monosit kemoçekici protein 1 (MCP-1) ve makrofaj infiltrasyonunun indüklenmesiyle oluşan kronik kardiyak inflamasyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu yükselmenin dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ) ve Ang II düzeyi ile birlikte AT1R düzeyini de arttırdığı vurgulanmıştır (Kudo ve ark., 2009). Ang II ve aldosteronun birlikte kardiyak fibrozisi indüklediği bilinmektedir. Farelerde yapılan bir çalışmaya göre mineralokortikoid aktivasyonunun kalpte Ang II'nin fibrotik etkisini arttırdığı, bunun da sadece inflamasyon artışı ile değil aynı zamanda nikotinamid dinükleotit fosfat oksidaz 2 (NOX2) ekspresyonundaki artışa bağlı olarak gerçekleşen oksidatif stres artışından dolayı olduğu belirtilmiştir (Di Zhang ve ark., 2008). Bu bilgilere ilaveten kardiyovasküler hastalık biyoişaretçisi olan C-reaktif proteinin aşırı sentezi

sonucunda Ang II kaynaklı kardiyak yeniden modellenmenin artış gösterdiği, bu artışın da AT1R, TGF- $\beta$  ve NF- $\kappa$ B üretimini arttırdığı ve sonuç olarak kardiyak fibrozis ve inflamasyon meydana getirdiği bildirilmiştir (Graf ve Schaefer-Graf, 2010; Huang ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2010).

Kalp yetmezliğinde (HF) lokal Ang II konsantrasyonu artmaktadır. Bu artışın büyüklüğü kalp yetmezliğinin derecesiyle doğru orantılı olarak değişim göstermektedir (Sernerive ark., 2001). HF'nin belirtilerinden biri de sol ventrikül hipertrofisidir. Mazzolai ve ark. transgenik farelerde yaptığı çalışmada sistemik kan basıncını etkilemeden hipertrofi oluşturmuşlar ve bu durumu ACE inhibitörleri ve AT1R blokörleri kullanarak engelleyebildiklerini göstermişlerdir (Mazzolai ve ark., 1998). Bu bilgiye ilaveten aynı tip transgenik farelere uzun süreli Agt aşırı üretimi oluşturulduğunda Ang II sentezinde artış gözlemlendiği ve bu artışa bağlı olarak da sistolik ve diyastolik fonksiyon bozukluklarının meydana geldiği gösterilmiştir (Domenighetti ve ark., 2005).

HF durumunda gözlemlenen en önemli değişiklikler kasılma fonksiyonunda gerçekleşmektedir. Bu fonksiyonun düzenlenmesinde hücresel düzeyde etki eden en önemli mekanizma  $Ca^{2+}$  homeostazıdır. HF'de artmış Ang II ile korele olarak SERCA2a protein üretiminde ve SR  $Ca^{2+}$  içeriğinde bir azalma ile birlikte, SR  $Ca^{2+}$  sızıntısında da bir artış gözlemlenmektedir (Iijima ve ark., 1998). İskemi durumunda da Ang II ve AT1R düzeylerinde gözlemlenen artış, hem iskemik alanın hem de durumun etkisinin artmasında rol oynamaktadır (Schwarz ve ark., 1997). Bu bilgilere ek olarak farklı kardiyomiyopatik durumlarda da RAAS aktivitesinin artması ROS, inflamasyon, fibrozis ve hipertrofik durumların oluşmasını ve sonuç olarak diyastolik ya da sistolik fonksiyon bozukluklarının gerçekleşmesini sağlamaktadır (Dai ve ark., 2011; Somanna ve ark., 2016; Sifi ve ark., 2017).

Pfeffer ve ark. yaptığı çalışmalara göre ACE inhibitörlerinin miyokardiyal infarktüs sonrası gelişen kalp hastalığı olgusunu kayda değer bir şekilde engellediği gösterilmiştir (Pfeffer, 1995; Pfeffer ve Frohlich, 2006). Ayrıca yapılan çalışmaların sonucunda ACE inhibitörlerinin kullanımının miyokard infarktüsün oluşumunu engellediğine de değinilmektedir (Yusuf ve ark., 1991; Pfeffer, 1995; Pfeffer ve Frohlich, 2006).

AT1R aktivasyonu hipertansiyon, kardiyak hipertrofi ve kalp yetmezliği gibi olgularda kritik rol oynayabilen  $G_{q/11}$  üzerinden gerçekleştirmektedir (Kumar ve ark., 2009; Kumar ve ark., 2012). AT1R ile ilişki içerisinde olan  $G_q$  fosfolipaz C (PLC) aktivasyonunu sağlayarak fosfotidil inozitol difosfat (PIP2)'den diaçil gliserol (DAG) ve IP3'ün meydana gelmesine neden olur (Kumar ve ark., 2008; Kumar ve ark., 2009). Bu iki molekül hem hücre içi kalsiyum düzenlemesinde hem de DAG aracılı PKC'nin de devreye girmesiyle kasılma fonksiyonlarına, dolayısıyla da kardiyak hipertrofi ve fibrozis gibi durumların oluşumu üzerine de etki edebilmektedir (Kumar ve ark., 2008; Kumar ve ark., 2009). Ang II diğer G proteinleri ( $G\alpha, G_{12/13}, G_i, G_{\beta\gamma}$ ) üzerinden de aktivitesini gösterebilmektedir. Bu proteinler aracılığıyla adenil siklaz inhibisyonu ya da siklik adenosin monofosfat (c-AMP) artışı, hücre göçü, hipertrofi, yeniden modellenme, ROS artışı dolayısıyla inflamasyon, hipertrofi, fibrozis, kalp yetmezliği ve iskemik kalp hastalığı gibi durumlara neden olabilmektedir (Baker ve ark., 2004; Kumar ve ark., 2008; Singh ve ark., 2008a, Singh ve ark., 2008b, Kumar ve ark., 2009, Kumar ve ark., 2012).

Gedik kavşak'ın elektriksel uyarı akışına karşı direnç oluşturmaması uyarı yayılımının ve kalp ritminin bozulmasına neden olur (De Mello, 2001). Ayrıca, hücre iletişiminin baskılanması, kasılma sürecine katılamayan çok sayıda miyosit sekestrasyonuna neden olarak kalbin kasılma kuvvetini azaltır. Histolojik çalışmalar kalsifikasyon, nekrozis ve intersitisiyal fibrozisin anizotropiye ve bozulmuş uyarı yayılımına neden olduğunu göstermektedir (De Mello, 1997a; De Mello ve ark., 1997b). Yetmezlik durumundaki bir kalpte lokal RAAS aktivasyonu hücre birleşiminde azalmaya neden olmaktadır. Gedik kavşak proteinlerinin fosforilasyonundaki geri dönüşümlü değişikliklerin hücre birleşiminin kontrolünde rol oynadığı bilinmektedir (Severs, 1994; De Mello, 1996; Imanaga ve ark., 2004). Dolayısıyla kardiyak RAAS hücreler arası iletişimin bir modülasyon mekanizması olarak gösterilebilmektedir. Ang II, hücre birleşmesi üzerine etkisini konneksin 43 fosforillenmesini bozarak gerçekleştirmektedir. Bu etkiyi PKC ve tirozin kinaz aktivasyonları üzerine etki ederek gerçekleştirmektedir (De Mello, 1996; Yu ve ark., 1996; De Mello ve Danser, 2000; De Mello, 2002). Sonuç olarak Ang II gedik kavşak kondüktasını azaltarak aritmi oluşmasına katkı sağlaması yanında aritmi oluşum sıklığını da arttırabilmektedir (De Mello, 2001).

Kronik Ang II uygulaması AP'nin repolarizasyon süresini uzatarak LQT (uzamış QT sendromu) gibi patolojik durumların oluşmasına neden olmaktadır. Bu değişim  $I_{K1}$ 'in baskılanmasıyla gerçekleşmektedir (Domenighetti ve ark., 2007). Bir başka potasyum akımı  $I_{to}$  genliklerinde ya da kinetiklerinde bir değişiklik yaratmamasına rağmen, kardiyak yeniden modellenme gelişip gelişmemesine bağlı olarak kanalları oluşturan proteinlerin mesajcı ribonükleik asit (mRNA) üretimleri üzerine etkileri bulunduğu fark edilmiştir (Tozakidou ve ark., 2010). Ventriküler AP'nin diğer biyopotansiyellerden şekilsel olarak farklılığını sağlayan temel iyon  $Ca^{2+}$ 'dır. Kültüre edilmiş insan kardiyomiyositlerine Ang II uygulaması sonucunda T-tipi  $Ca^{2+}$  akımlarında artış, L-tipi olanlarda ise azalış gösterilmiştir. Yapılan çalışmanın ilerleyen kısımlarında bu değişimin PKC yolağı tarafından düzenlendiği bulgusuna da ulaşılmıştır (Bkaily ve ark., 2005). Ang II uygulaması AP'nin depolarizasyonunu sağlayan  $I_{Na}$ 'da PKC aracılığıyla azalmaya sebep olmaktadır (Mathieu ve ark., 2016).

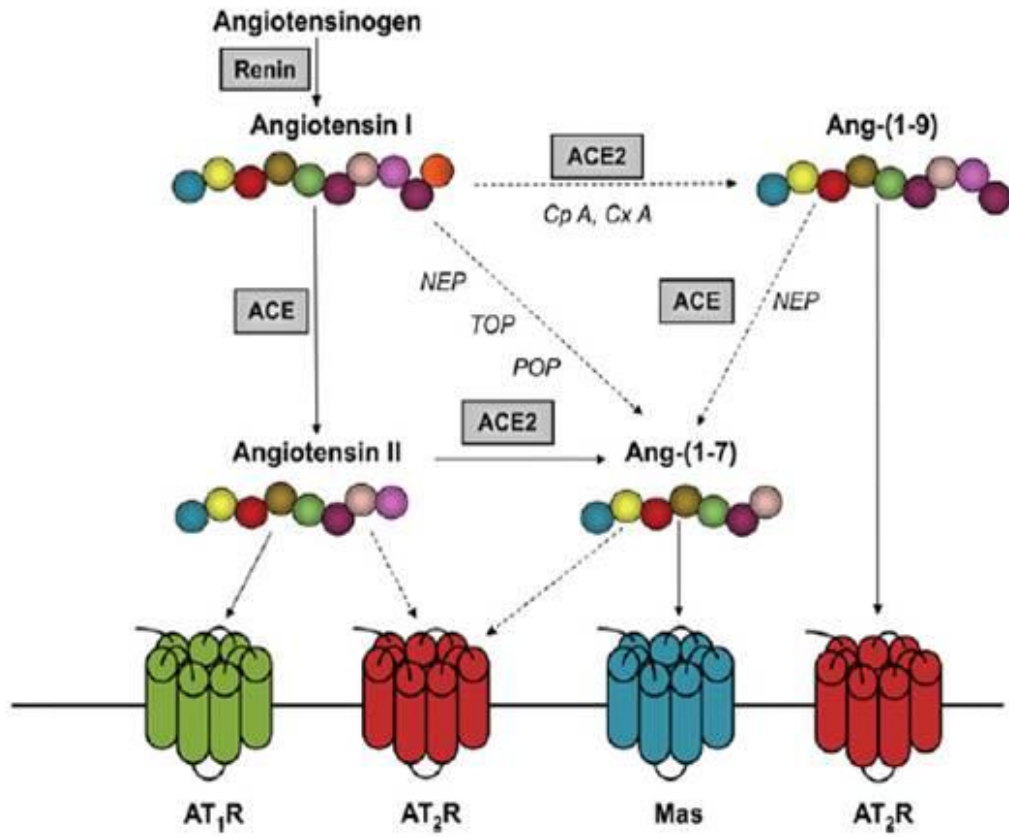
Ang II ya da bu peptidin oluşumunu sağlayan enzim olan ACE düzeyinde ya da aktivitesindeki artışlar uyarımın iletilmesiyle ilgili olumsuzlukların meydana gelmesini de sağlamaktadır. Kalsiyum/kalmodulin kinaz 2 (CaMKII) sinyalinin aracılığıyla Ang II "after depolarizasyon" oluşumunu tetikleyebildiği gibi (De Mello, 2009; Zhao ve ark., 2011), yerel ACE üretiminin artması da gedik kavşak oluşumunda temel etmen olan konneksin fonksiyon bozukluğuna, dolayısıyla da uyarımın iletilmesinde bozukluklara neden olmaktadır (Kasi ve ark., 2007).

Ang II uygulaması SR  $Ca^{2+}$  içeriğindeki azalmayla sonuçlanan  $Ca^{2+}$  düzenlenmesinde değişiklikler yaparak uyarılma-kasılma çiftleniminde bozulmaya ve dolayısıyla kasılabilirlikte değişikliklere neden olmaktadır (Gusev ve ark., 2009).

#### **2.3.4. Yeni Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi (ACE2/Ang (1-7)/MasR)**

RAAS'a olan geleneksel bakış açısı büyük ölçüde, ACE2 enziminin keşfedilmesinin ardından önemli değişiklikler geçirmiştir (Donoghue ve ark., 2000; Harmer ve ark., 2002; Vickers ve ark., 2002). ACE2, ACE ile yaklaşık %42 özdeşliği paylaşan ve kalp, damar sistemi ve böbrek gibi birçok dokuda yüksek oranda eksprese edilen bir homolog enzimdir (Donoghue ve ark., 2000, Harmer ve ark., 2002; Vickers ve ark., 2002). Yapısal farklılıklar nedeniyle, ACE esas olarak bir peptidildipeptidaz gibi davranırken, ACE2 bir karboksipeptidaz görevi görür (Vickers ve ark., 2002). ACE2, Ang I ve Ang II'den gelen C terminali rezidülerini parçalar, böylece Ang II

düzeylerini düşürür ve Ang (1-9) veya Ang (1-7) üreterek RAAS'ta işlevini yerine getirir (Donoghue ve ark., 2000). Ang (1-7) çoğunluğu ACE2'nin aktivitesi yoluyla üretilir. ACE2'nin afinitesi, Ang II'ye Ang I'e göre yaklaşık 400 kat fazla olduğu için Ang (1-7)'nin üretiminde ana ürün Ang II'dir (Tipnis ve ark., 2000). Ang (1-7), Ang (1-9)'un ACE ile veya prolil endopeptidaz (POP), nötr endopeptidaz (NEP) veya timepin oligopeptidaz (TOP) dahil olmak üzere alternatif enzimlerin eylemleri sonucunda hidroliz yoluyla da üretilebilmektedir (Chappell ve ark., 1998; Donoghue ve ark., 2000; Rice ve ark., 2004).



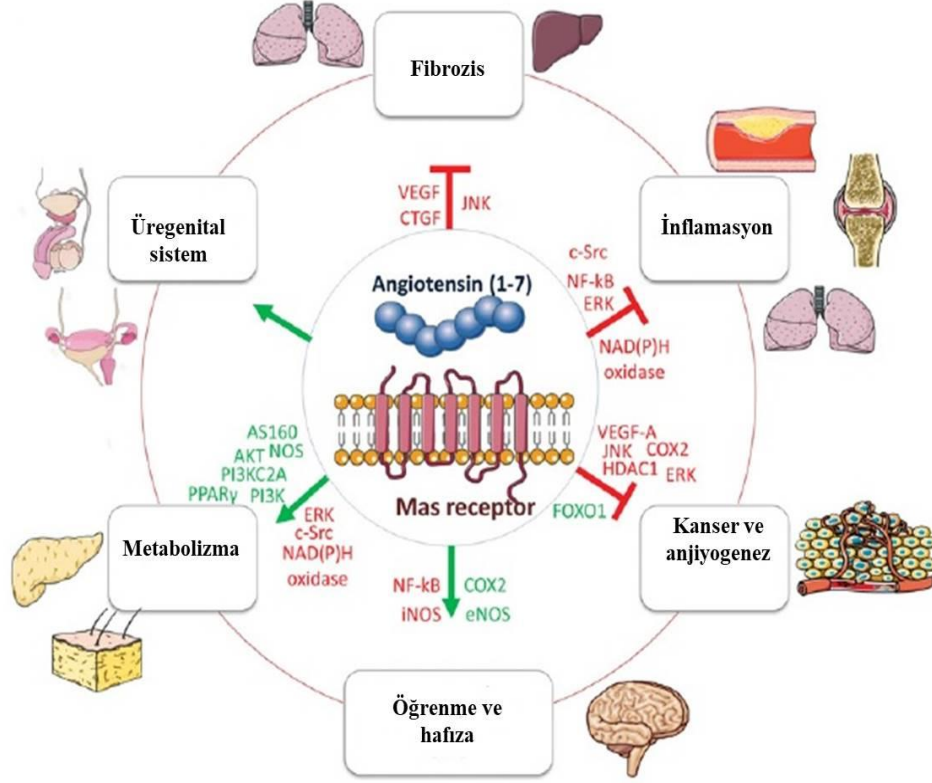
**Şekil 2.4.** Yeni RAAS olarak nitelendirilen ACE2/Ang (1-7)/MasR yolğunın da eklenmesiyle oluşan renin-anjiyotenin-aldosteron sistemi.

Sirkülasyondaki Ang (1-7) yarılanma ömrü yaklaşık 10 s olup (Chappell ve ark., 1998) seviyeleri de 20 pg/ml dolaylarında olduğu rapor edilmiştir (Vilas-Boas ve ark., 2009). Ang (1-7)'nin etkisini hücre düzeyinde AT<sub>1</sub>R ve AT<sub>2</sub>R aracılığıyla değil, G-proteini ilişkili MasR aracılığıyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Rowe ve ark., 1995, Santos ve ark., 2003). Bu yolak Şekil 2.4.'de şematize edilerek gösterilmektedir.

MasR 1984 yılında ilk defa maya hücrelerinde bir mutant olarak mitokondriyal düzenek proteini 1 (mas1) olarak tanımlanmıştır ve hakkında neredeyse hiçbir bilgi bulunmamaktadır (Yaffe ve Schatz, 1984). 2003 yılında Santos ve meslektaşları Mas proteininin, akut su yüklenmesine ve arteriyel gevşeme tepkisine karşılık Ang (1-7) sinyalinin anti-diüretik etkisinin iletilmesini sağlayan G-proteini bağlı reseptör olduğunu (GPCR) bildirmiştir (Santos ve ark., 2003). Şu anda biriken kanıtlar Ang (1-7)/MasR sinyalinin Ang II/AT1R sinyali tarafından oluşturulan vazokonstriktif, fibrotik ve hipertansif etkilere zıt yönde sinyal yollarını etkinleştirdiğini önermektedir (Passos-Silva ve ark., 2013; Forrester ve ark., 2017). Ang (1-7)/MasR sinyalinin bu yararlı etkilerinin mekanizması temel olarak nitrik oksit (NO) sinyalizasyonu ile açıklanmaktadır. Ang (1-7)/MasR sinyalinin aktivasyonu, endotelial hücreler ve kardiyomiyositlerde PI3K/Akt/eNOS yoluyla NO üretimini arttırmaktadır (Sampaio ve ark., 2007; Dias-Peixoto ve ark., 2008). MasR ile ilişki içerisinde olan PI3K/Akt yolağı, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) fosforilasyonu, NO salınımının aktive edilmesi, anti-atrofik etki ve adipogenezisi teşvik etme süreçlerinde kardiyovasküler sistem üzerine olan etkilerini ortaya çıkarmaktadır (Touyz ve Schiffrin 2000; Cisternas ve ark., 2015; Zhao ve ark., 2015).

Bu bilginin yanında MasR, PI3K/Akt ve JAK/STAT yollarında gerçekleştirdiği değişikliklere bağlı olarak insülin sinyalinin düzenlenmesinde de etkin olduğu bilinmektedir (Giani ve ark., 2007; Munoz ve ark., 2010; Verano-Braga ve ark., 2012). Son olarak, MasR aktivitesinin birçok kardiyak patolojik koşulda değişime uğrayabileceği, bu süreçlerin gidişatını olumlu ve/veya olumsuz yönde etkileyebilme kapasitesine sahip olabileceği ve hücre içi kalsiyum düzenlenmesine de  $G_q/G_{11}$  proteini üzerinden PKC aracılığıyla etki edebileceği yapılan çalışmalarca gösterilmiştir (Canals ve ark., 2006; Gomes ve ark., 2012). Buna ek olarak Mello ve ark. (De Mello, 2015) yaptığı çalışma sonucunda protein kinaz A (PKA)'nın da kalsiyum düzenlenmesine katkı sağlayabileceği bilgisine ulaşılmıştır. Yine de, MasR aracılı sinyal mekanizmasının kalsiyum üzerine bu düzenlemeyi nasıl gerçekleştirdiği hala tam anlamıyla netlik kazanmamıştır (Tirupula ve ark., 2014; Wang ve ark., 2014).

ACE/Ang II/AT1R yolağına karşı dengeleyici bir rol oynadığı gösterilen ACE2/Ang (1-7)/MasR yolağının, sistemik olarak olumlu etkileri yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur ve Şekil 2.5.'da şematik olarak gösterilmektedir.



**Şekil 2.5.** Anjiyotensin (1-7)/MasR yolağının sistemik olarak etki ettiği fonksiyonların şematik gösterimi.

RAAS sistemik olarak kan basıncının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu açıdan yeni RAAS ayağını oluşturan bu üç basamak ayrı ayrı incelenmiştir. ACE2'nin transgenik olarak üretilmesinin engellendiği fare modellerinde kan basıncı yükseldiği fark edilmiştir. Bu bilginin yanı sıra Ang II birikmesinde artış ile birlikte Ang II indüklü hipertansiyon oluşma olasılığının yükseldiği gösterilmiştir (Gurley ve ark., 2006). Spontan hipertansiyonda merkezi sinir sisteminin farklı bölgelerinde ACE2 aktivitesinin artırılmasının kan basıncının düşmesine neden olduğu bilgisi farklı araştırmacılar tarafından ortaya çıkarılmıştır (Yamazato ve ark., 2007; Rentzsch ve ark., 2008). Farmakolojik olarak ACE2'nin uygulanması sonucunda da benzer etkilerin gözlenmesi ACE2'nin patofizyolojik koşullarda kan basıncını düzeltici etkisini netleştirmektedir (Hernandez Prada ve ark., 2008; Wysocki ve ark., 2010; Ye ve ark., 2012). Ancak Ang (1-7) için bu birliktelik sağlanamamaktadır. Normal ve yüksek kan basıncına sahip deney hayvanlarına sistemik olarak Ang (1-7)

infüze edilmesi sonucunda bir değişiklik gözlenmezken (Campagnole-Santos ve ark., 1992; Lima ve ark., 1997; Sampaio ve ark., 2003), dahl-tuz duyarlılığına sahip hipertansiyon modelinde ise ortalama kan basıncını azaltmıştır (Bayorh ve ark., 2002). Ang (1-7) akut olarak uygulandığında Ang II indüklü hipertansiyona herhangi bir etki göstermezken (Wysocki ve ark., 2010), normal kan basıncına sahip olanlarda hipotansiyon gelişmesine neden olmuştur (Lima ve ark., 1997). Ang (1-7) uygulamasının kronik olarak uygulandığı farklı hipertansiyon modellerinde ise hipertansiyon koşullarını engelleyici etkisi ortaya konmuştur (Benter ve ark., 1995; Grobe ve ark., 2006; Shah ve ark., 2012). Merkezi sinir sistemine Ang (1-7) uygulanması ise daha kaotik sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Hipertansif (Nakagaki ve ark., 2011), hipotansif (Guimaraes ve ark., 2012) ve etkisinin gözlenmediği (Campagnole-Santos ve ark., 1992) sonuçlarla karşı karşıya kalınmıştır. MasR eksikliği oluşturulan modellerde baro refleks fonksiyonunda azalma, endotelyal fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak kan basıncında artış olduğu gözlenmiştir (Xu ve ark., 2008; de Moura ve ark., 2010). Bu bilgiler ışığında yolağın hipertansiyona karşı etkili olabileceği yorumu yapılabilse de, uygun basamağın uyarılmasının etkinin kesinliğini sağlamakta önemli olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

Artan kanıtlar, fibrozise karşı Ang (1-7) 'nin koruyucu bir rol oynadığını göstermektedir. Bu patolojik durum, kollajen gibi hücre dışı matriks elemanlarının fibroblastlar tarafından aşırı birikmesi ile karakterizedir (Ghosh and Vaughan 2012). Olgun fibroblastların öncülleri olan dolaşımdaki fibrositlerin çoğalmasının, doku fibrozunun ilerlemesinde rol oynadığı ve miyokardiyal fibrozun öncülü olabileceği tanımlanmaktadır (Krenning ve ark., 2010). Son zamanlarda yapılan bir çalışma, Ang (1-7) 'nin bu hücrelerin apoptozuna neden olduğunu, proliferasyonu inhibe ettiğini ve kollajen salgılanmasını azaltarak kardiyak fibrozun gerilemesine yol açtığını göstermektedir (Wang ve ark., 2012). Gerçektende, Ang (1-7) miyokardiyal fibroza karşı koruma sağlayarak Ang II'nin etkilerini dengelemektedir (Oudit ve Penninger, 2011). Dahası MasR'nin farelerde üretilmesinin engellenmesi sağlanarak hücre dışı matriks içeriğinde profibrotik düzenlemenin artması sağlanabilmiştir (Santos ve ark., 2006). Bu farelere rhACE2 uygulaması kardiyak fibrozis gelişimini engellemiş, Ang II düzeyini azaltmış ve Ang (1-7) düzeyini de arttırmıştır (Zhong ve ark., 2010).

Kardiyak fonksiyonunun yanı sıra, Ang (1-7) akciğer, böbrek ve karaciğer gibi farklı organlarda da fibrozu azaltabilmektedir. Safra kanalı bağlanmasıyla oluşturulan karaciğer fibroz modeliyle yapılan çalışmada, Ang (1-7) uygulaması kollojen ve hidroksiprolin içeriğini azaltıp, kollojen tip 1 alfa (IA1), alfa düz kas aktini ( $\alpha$ SMA), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve birleştirici doku büyüme faktörü (CTFG) gen ekspresyonlarını kısıtlayarak fibrozisin oluşmasına farklı açılardan engel olabildiğini göstermektedir (Lubel ve ark., 2009).

Bleomisin uygulanmasıyla meydana gelen pulmoner fibroz patolojisinde, Ang (1-7) veya ACE2 üretiminin artırılmasının kollojen ve pro-inflamatuvar sitokin içeriğinin azalmasını sağlayarak fibrotik süreçleri engellediği bulgusuna ulaşılmıştır (Shenoy ve ark., 2010). Ayrıca Ang (1-7) ile ön inkübasyon sonucunda Ang II ya da bleomisin kaynaklı pulmoner fibrozun belirteçlerinden olan alveolar epitel hücre apoptozuna karşı önleyici bir özelliğinin de olduğu gösterilmiştir (Uhal ve ark., 2011). Bu hücrelerde Ang (1-7) 'nin anti-apoptotik etkisi, c-jun N-terminal kinaz (JNK) fosforilasyonunun inhibisyonu ile meydana gelmektedir. Bu gözlemler, antifibrotik tedavi için potansiyel bir strateji olarak ACE2/Ang (1-7)/MasR ekseninin aktivasyonunu önermektedir.

Klasik RAAS'ın, pro-inflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırarak inflamatuvar sürece katkıda bulunduğu bilinmektedir (Ruiz-Ortega ve ark., 2002; Ruiz-Ortega ve ark., 2006; Marchesi ve ark., 2008). Bu olgunun aksine, son çalışmalar Ang (1-7) 'nin MasR ile etkileşim yoluyla bir anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ang (1-7) uygulanan fare peritoneal makrofajlarında, lipopolisakkarit uyarılmasından sonra gelişen tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-6 (IL-6)'nın da dahil olduğu pro-inflamatuvar sitokin ekspresyonunun azaldığı bulgusuna ulaşılmıştır (Souza ve Costa-Neto, 2012). Bu etkinin mekanizması, Ang (1-7) uygulaması sonucunda inflamasyonu modüle ettiği bilinen c-Src'nin defosforilize edilmesiyle gerçekleşmektedir. Antijen indüklü artrit (AIA) patolojisinde Ang (1-7) ve bir MasR agonisti olan AVE0991 (peptid olmayan Ang (1-7) reseptör agonisti) tedavisi sonucunda iyileşme süreci başlamıştır. AIA'nın neden olduğu nötrofil birikimi, ayrıca hipernosisepsiyon ve TNF- $\alpha$  ve IL-1b gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin ve CXC kemokin ligand 1(CXCL1)'in üretiminin Ang (1-7) ile, lökosit ve adhezyon

moleküllerinin ise AVE0991 ile azaldığı bildirilmiştir (da Silveira, Coelho et al. 2010). Ang (1-7) 'den etkilendiği bildirilen bir başka inflamatuvar durum, endotel disfonksiyon, vasküler inflamasyon ve damar duvarının intiması içinde lipit birikimi ile karakterize olan aterosklerozdur. Bu durum muhtemelen Ang (1-7)'nin ROS üretiminde rol oynayan NADPH oksidaz ekspresyonunu inhibe etmesi ve antijen üreten hücrelerin ekspresyonun baskılanmasından dolayı kaynaklanmaktadır (Jawien ve ark., 2012). Ek olarak ACE2 ekspresyonu sayesinde daha az makrofaj infiltrasyonu ve lipit birikimi olmasının (Lovren ve ark., 2008) ve aterosklerotik plakların daha stabil olmasının etkileri de önemli derecede yer almaktadır (Dong ve ark., 2008).

Ang (1-7) 'nin etkileri son zamanlarda solunum yollarının inflamatuvar koşullarında da değerlendirilmiştir. Alerjik astımın fare modelinde uygulanan Ang (1-7) sonrasında perivasküler ve peribronkiyal inflamasyon ile fibrozisde de iyileşme bulgularına ulaşılmıştır. Bu düzelmenin alerjik astım modelinin oluşmasına neden olan ovalbuminin ERK ve NF- $\kappa$ B yollarında neden olduğu aşırı fosforillenmenin engellenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (El-Hashim ve ark., 2012). Akciğer inflamasyon artışına neden olan bir diğer olgu da akut solunum distress sendromu (ARDS)'dir. Lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturulan ARDS sonucunda meydana gelen akciğer hasarında ve inflamasyon koşullarında Ang (1-7)'nin intratrakeyal bölgeye uygulanmasına bağlı olarak azalmalar görülmüştür (Wosten-van Asperen ve ark., 2011). Bu sonuçlar neticesinde, yerel Ang (1-7) seviyelerinin, bu sendromun gelişmesini ve ilerlemesini önlemede çok önemli olduğu gösterilmiştir.

Kardiyak dokuda Ang (1-7)'nin etkileri kapsamlı bir şekilde ele alınmaktadır. Kalp yetmezliği farklı birçok patofizyolojik koşula bağlı olarak gelişebilmektedir. Bunlardan bazıları sistemik etkilerin sonucunda ortaya çıksa da, bazıları kardiyak dokuda oluşan aritmi, miyopati ya da miyokardiyal infarktüs (MI) gibi olgulardan dolayı da gerçekleşebilmektedir. Hipertansiyon bahsettiğimiz bu sistemik etkilerden biridir. Hipertansiyon indüklü fibrozis modeli olan SHR'nin kalplerinde kardiyak Ang (1-7) ve MasR düzeylerindeki azalmadan kaynaklı kollojen birikimi gözlenmiştir (Varagic ve ark., 2010; Gava ve ark., 2012) ve Ang (1-7) uygulaması sonucunda miyokardiyal ve perivasküler fibrozisin engellendiği gösterilmiştir (Grobe

ve ark., 2006). Bununla birlikte isoproterenol ile oluşturulan kardiyak stres sonucu ortaya çıkan hipertorfik koşullara karşı Ang (1-7) uygulananlar uygulanmayanlara göre daha dirençli davranmışlardır (Santos ve ark., 2004, Ferreira ve ark., 2010). Basınç yüklenmesiyle oluşturulan kardiyak yeniden modellemede, rhACE2 uygulanarak Ang (1-7) arttırılmasına bağlı olarak gelişmesi beklenen dilatatif kardiyomiyopatide gerileme olduğu bulgusuna ulaşılmıştır. Bu değişimin mitojenle aktive olan JAK2/STAT3 ve PKC aktivasyonunun inhibe edilmesi ve Ang II aracılı ERK1/2 aktivasyonunun azaltılmasıyla gerçekleştiği gösterilmiştir (Zhong ve ark., 2010). Bunun yanında kardiyak ROS üretimini azaltarak NO üretiminin arttırması da koruyucu etkisine katkı sağlamıştır.

MI modeli sol anterior inen koroner arter (LAD)'nin ligasyonu neticesinde oluşturulmaktadır. LAD'nin bağlanması takiben direkt sol ventriküle gönderilen Ang (1-7) sonucunda sol ventrikül duvar incelmeleri ve hipertrofik süreçlerin önlenmesi ve ACE2 aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Bununla beraber Ang (1-7)'nin pro-inflamatuar sitokinler olan TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerinin de azalmasına neden olarak anti-inflamatuar özelliklere sahip olabileceği düşünülmektedir (Qi ve ark., 2011). Fibroz ve hipertrofiyle ilgili kardiyoprotektif etkilerin yanı sıra, Ang (1-7)'nin VEGF-D ve matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9)'un regülasyonunu arttırarak infarktli sıçan kalplerinde MasR'ye bağlı bir şekilde anjiyogenezi arttırdığı gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2013). Dolayısıyla iskemik durumdan dolayı kaynaklanabilecek HF'deki kardiyak fonksiyonların düzelmesinde etkin bir rolü olabileceği söylenebilmektedir (Averill ve ark., 2003).

Yapısal yeniden modelleme değişiklikleri kardiyak fonksiyon ve kontraktileti olumsuz yönde etkilemektedir. Sonunda kasılma fonksiyonundaki bozulma diyastolik fonksiyon bozulmasına ve aritmilerin oluşmasına olanak sağlamaktadır (Fomovsky ve ark., 2012; Weber ve ark., 2013). Kardiyomiyositlerin elektriksel uyarılmasıyla gerçekleşen kardiyak kasılma hücresel düzeyde ECC ile açıklanmaktadır. ECC Ang II düzenlenmesinden etkilenmektedir. Ang II  $Ca^{2+}$  taşıyıcı proteinlerin  $Ca^{2+}$  duyarlılığını ve iyon akımlarını etkileyerek hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunu değiştirir. Bu da kardiyak kontraktileti bozmaktadır (Gusev ve ark., 2009). LAD ligasyonu ile oluşturulan MI patolojisine Ang (1-7) uygulanması sonucunda hem yapısal değişiklikler korunmuş hem de kardiyak fonksiyonun düşüşü

engellemiştir (Qi ve ark., 2011). EKG ve hemodinamik ölçümler fraksiyonel kısalmada ve sol ventrikül sistolik basıncında iyileşmeler ve sol ventrikül diyastolik basınçtaki artışın azaldığını göstermektedir. Ang (1-7) 'nin faydalı fonksiyonel etkileri, sıçan HF modelinde peptit infüzyonu kullanılarak gösterilmiştir. Burada peptit infüzyonlu hayvanlarda sol ventrikül sistolik ve diyastolik basıncın restorasyonu gözlenmiştir (Loot ve ark., 2002). Ang II infüze edilmiş kardiyomiyositlerde hücre içi  $[Ca^{2+}]_i$  genliğinde %26'lık bir azalma gözlenmişken, Ang (1-7) uygulananlarda bu değişime rastlanmamıştır. Bu durumun, kasılma fonksiyon bozukluğunun ve kalp yetmezliğinin gelişmesinde önde gelen nedenlerden olan kardiyomiyosit kalsiyum işleme proteinlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin ve özellikle hücre içi ve SR  $Ca^{2+}$  konsantrasyonlarındaki değişikliklerin gerçekleşmesine engel olabilmesinden kaynaklanmaktadır (Domeier ve ark., 2009; Gomes ve ark., 2010). Buna benzer bir çalışma da transgenik olarak Ang (1-7) ekspresyonunun artması sağlanan sıçanlarda yapılmıştır. Bu çalışmanın kontrol hayvanlarında oluşturulan MI modelinde  $Ca^{2+}$  transient hızı yavaşlamıştır. Ancak transgenik olanlarda bu durum gözlenmemiştir. Bunun nedeni de transgenik olanlarda Ang (1-7) artışına bağlı olarak  $Ca^{2+}$  transient genliğinde, azalış hızında ve SERCA2a ekspresyonundaki artış sayesinde kardiyak fonksiyonun korunabilmesiyle alakalı olmasıdır (Ferreira ve ark., 2010). Hücre içi Ang (1-7) artışının sağlandığı bir çalışmada  $I_{CaL}$ 'nin arttığını ve bu artışın PKA üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir (De Mello, 2015). Bu verinin yanında isoproterenol indüklenmesiyle oluşan HF modeli ile yapılan başka bir patch-clamp çalışmasında Ang (1-7) uygulamasının olumlu etkisini göstermektedir. Buna göre HF'de azalan  $I_{CaL}$ 'nin, Ang (1-7) süperfüzyonu ile geri döndürülebildiği vurgulanmıştır (Zhou ve ark., 2015).

İletim bozukluğu kardiyak dokuda aritmik koşulların ortaya çıkmasında bir etken olarak düşünülmektedir. Ang 1-7 uygulamasının  $I_{Na}$  yoğunluğunu arttırarak atrial iletimi düzenlediği ve atriyal fibrilasyon (AF)'nin olumsuz etkisinde azalma oluşturduğu ortaya konmuştur (Wang ve Li, 2014). Ayrıca hücre zarındaki  $Na^+$  pompasını düzenleyerek ileti hızının artmasına ve anti-aritmik bir etki oluşmasına yardımcı olmaktadır (De Mello, 2004).

Hem pankreas (Leung ve ark., 1999) hem de yağ dokusu (Schling ve ark., 1999) RAAS bileşenleri içerir ve bu lokal RAAS besin alımı ile yüksek oranda

düzenlenmektedir. Yüksek şekerli bir diyet pankreastaki (Lupi ve ark., 2006) Agt, ACE ve AT1R'nin ekspresyon seviyelerini arttırmasına rağmen, yağ veya şeker açısından zengin bir diyet de yağ dokusundaki ACE2 ve Ang (1-7) konsantrasyonunu arttırmaktadır (Gupte ve ark., 2008; Coelho ve ark., 2010). RAAS şu anda, obezite, insülin direnci, hipertansiyon, diyabet, hiperinsülinemi ve dislipidemi birlikteliği ile karakterize bir bozukluk olan metabolik sendromun tedavisi için potansiyel bir hedef olarak kabul edilmektedir (Reaven ve ark., 1988; Grundy, 2004). İnsülin yoksunluğu ya da direncinin gelişimi kardiyovasküler rahatsızlıklar ile sıkı bir ilişki içerisinde (Oliveira ve ark., 2002; Bindom ve ark., 2010; Singh ve ark., 2011; Liu ve ark., 2012). Bu gözlemler aynı zamanda Ang (1-7)'nin önemli bir anti-hiperglisemik etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. İnsülinin Ang (1-7) ile pozitif bağdaşa sahip olmasının nedeni olarak ortak sinyal yollarını kullanmaları gösterilmektedir (Giani ve ark., 2007; Sampaio ve ark., 2007). Bununla birlikte iskelet kası, karaciğer ve yağ dokusunda Ang II/AT1R yolağının aktivasyonunu da engelleyerek (c-Src ve ERK defosforilasyonu, NADPH oksidaz inhibisyonu) pozitif etkisini göstermektedir (Sampaio ve ark., 2007; Munoz ve ark., 2012).

Lipid metabolizması Ang (1-7) tarafından da düzenlenmektedir. Bu heptapeptit ile tedavi edildiğinde, diyabetik kardiyomiyopati (Singh ve ark., 2011) ve diyabetik nefropatisi (Singh ve ark., 2010) olan sıçanların MasR'ye bağlı bir şekilde dislipidemisi önemli bir azalma göstermektedir. Dahası, Mas-nakavt farelerde dislipidemiye, düşük glukoz toleransına, insülin duyarlılığına, hiperinsülinemiyaya, hiperleptinemiyaya, düşük adiponektin salınımına, azalmış glukoz alımına ve artmış abdominal yağ kütlesine yol açan bozulmuş lipid metabolizmasına yol açtığı bulgusuna ulaşılmıştır (Santos ve ark., 2008). Diğer taraftan transgenik olarak plazma Ang (1-7) düzeyi arttırılmış modellerde normal besin alımına rağmen, yağ kütlesinde, triaçilgliserolde ve kolesterol seviyelerinde azalma gözlenmiştir (Santos ve ark., 2010). Ek olarak insülin duyarlılığı ve inflamasyon oluşumunda önemli rol oynayan adiponektin ve yağ asiti esterifikasyonu da dahil adipoz doku metabolizmasında rol alan adipoz lipid-bağlı protein 2 (AP2) seviyelerinin arttığı bulgusuna ulaşılmıştır.

Biriken kanıtlar ACE2 ve Ang (1-7) fonksiyonlarının diyabetten etkilendiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, ACE2 ve Ang (1-7) glukoz metabolizmasını

önemli ölçüde etkilemekte, bu da diyabetli hastalarda potansiyel yararlı etkilere sahip olabileceklerini göstermektedir. STZ uygulaması ile diyabet oluşturulan sıçanlarda ve obez olmayan diyabetli farelerde dolaşımdaki ACE2 aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (Yamaleyeva ve ark., 2012; Riera ve ark., 2014). İnsan ACE2'sinin genç db/db farelerinin pankreasında ektopik ekspresyonu, önemli ölçüde azalmış hiperglisemi, gelişmiş adacık fonksiyonu ve azalmış  $\beta$ -hücre apoptozu ile ilişkilendirilebilmektedir (Bindom ve ark., 2010). Aksine, ACE2 eksikliği glukoz toleransını ve diyetin indüklediği insülin duyarlılığını bozmaktadır (Takeda ve ark., 2013). Dolaşımda artmış Ang (1-7) konsantrasyonu aşırı beslenen sıçanlarda yağ dokusunda hiperinsülinemi, insülin direnci ve inflamatuvar yanıtları iyileştirirken (Giani ve ark., 2009; Marcus ve ark., 2013), normoglisemik sıçanlarda insülin duyarlılığının ve glukoz toleransının dengesini korumaktadır (Santos ve ark., 2010). Ayrıca, tip 2 diyabetli sıçan modelinde Ang (1-7) ile kronik oral tedavi, hipoglisemik etki yaratarak insülin duyarlılığı geliştirip hiperinsülinemiyi önlemektedir (Santos ve ark., 2014). ACE2 ve Ang (1-7)'nin glukoz metabolizmasındaki yararlı etkilerinin altında yatan mekanizmalar çok yönlü olabilir. İlk olarak lokal RAAS aktivasyonu, farklı dokularda insülin direnci ve diyabet gelişimini yönetmede önemli ölçüde ve farklı açılardan katkıda bulunmaktadır (Putnam ve ark., 2012; Underwood ve Adler, 2013). Bu nedenle, ACE2 tarafından Ang II üretimindeki azalışın glukoz metabolizması açısından önemli olabileceği düşünülmektedir. İkinci olarak, Ang (1-7) PI3K/Akt yolunu aktive eder ve böylece insülin indüklü sinyalizasyonu ve glukoz alımını kolaylaştırır (Sampaio ve ark., 2007; Giani ve ark., 2009; Munoz ve ark., 2010; Than ve ark., 2013). Ang (1-7) Ang II tarafından indüklenen MAPK yollarının aktivasyonunu engelleyerek ve insülin reseptörü substrat 1'in serin fosforilasyonunu önleyerek, Ang II tarafından indüklenen insülin sinyalinin disfonksiyonunu antagonize edebilir (Andreozzi ve ark., 2004; Su ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2010). Ayrıca, bulgular Ang (1-7)'nin, glukoz taşıyıcı tip 4 (GLUT4) ekspresyonunu arttırması ile glukoz alımını kolaylaştırdığını da göstermektedir (Takeda ve ark., 2013).

#### **2.4. Diabetes Mellitus**

*Diabetes mellitus*, temelde insülin salgılayan pankreatik adacık  $\beta$ -hücrelerinin hasarlanmasından [tip 1 diyabet (T1DM)] dolayı insülin yoksunluğunun ya da insülin reseptörlerinin duyarsızlaşmasından [tip 2 diyabet (T2DM)] dolayı oluşan insülin

direncinin meydana gelmesiyle ortaya çıkan bir endokrin/metabolik hastalıktır. Bu sendrom; esas olarak hiperglisemi ve glukozüri, ayrıca karbohidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluklara bağlı olarak polifaji, polidipsi, poliüri ve ketozis gibi belirtilerle karakterize edilmektedir. Diyabet hastalık tablosunun sıklıkla görülen diğer bulguları ise hiperglisemi sonucu glukozillenmiş hemoglobin düzeylerinde yükselme, mikroanjiyopati, makroanjiyopati ve nöropatidir. T1DM, insülin salgılanmasını sağlayan pankreatik  $\beta$  hücrelerinin % 80-90'nın hasarlanmasından dolayı meydana gelen muhtemelen çevresel faktörlerin tetiklediği genetik temelli bir otoimmün hastalıktır. Bütün otoimmün hastalıklar içerisinde T1DM'in görülme sıklığı her yıl % 3-4 oranında artmaktadır. T2DM daha karmaşıktır ve periferik dokuların insülin hareketine karşı direnç oluşturmasıyla meydana gelmektedir. Bu durumun sonucunda normal gliseminin sürdürülebilmesi için insülin ihtiyacı artar, ancak bu ihtiyaç karşılanamaz. T2DM'de insüline karşı oluşan direnç genetik duyarlılıktan dolayı gerçekleştiği kabul edilse de, obezite ile sonuçlanan aşırı düzensiz beslenme alışkanlığından ve fiziksel aktivite eksikliğinden kaynaklanan sosyolojik ve çevresel etmenlerden de etkilendiği düşünülmektedir. Obezite şu anda dünya çapında ciddi bir epidemi gerçekleştirmektedir. Güncel verilere göre dünya nüfusunun yaklaşık olarak % 8,3 (400 milyon) bu epidemiden etkilenmiş durumdadır ve 2035'de bu rakam % 8,9 (600 milyon) olacağı düşünülmektedir. Tedavi edilmeyen veya kötü kontrol edilen diyabet, vücudun dokuları ve organlarının çoğu için ciddi bir tehdittir. Göz, böbrek, kalp-damar sistemi gibi birçok organ sistemi diyabetin hedefleri arasındadır. İnsülin eksikliği/direncine bağlı hiperglisemi ve hiperlipidemi ilişkisi nedeniyle, kronik diyabette mikroanjiyopati, ateroskleroz, kardiyomiyopati ve kalp yetmezliği gibi çok çeşitli kardiyovasküler komplikasyonlar ortaya çıkar.

#### **2.4.1. Diyabetik Kardiyomiyopati**

DKM belirgin bir koroner hastalık olmadan gelişen genel bir diyabet komplikasyonu olarak tanımlanır (Rubler ve ark., 1972). DKM organ düzeyinde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişimlerin temelini, hücre metabolizmasının bozulması, oksidatif stresin uyarılması, ekstraselüler matriks içeriğinin değişimi ve fibrozis oluşumu, uyarılma-kasılma çiftlenimi değişiklikleri, insülin sinyalinin bozulması, hücre zarı ve hücre içerisindeki düzenleyici sinyal yollarının farklılaşması oluşturmaktadır.

Dolaşımdaki ve kardiyak Ang II düzeylerindeki fark özellikle diyabette belirgindir. DM dolaşımdaki reninin azalmasına dolayısıyla da Ang II'nin de azalmasına ya da değişmemesine neden olmaktadır (Giacchetti ve ark., 2005; Sica ve Ichihara, 2006). Ancak bunun yanında dokudaki RAAS aktivitesi önemli derecede artmaktadır (Singh ve ark., 2008a). İlaveten izole kardiyak miyositlerde ve fibroblastlarda yüksek glukoz maruziyetine yanıt olarak artmış renin proteini ve mRNA düzeyleri bildirilmiştir (Singh ve ark., 2007; Singh ve ark., 2008a).

DKM'de hiperglisemi artışına bağlı olarak Ang II'de artış gerçekleşmektedir. Bu artışı takiben AT1R aktivitesinde gerçekleşen artış sonucunda fibrozis artmaktadır (Westermann ve ark., 2007a, Lee ve ark., 2014). Bununla birlikte inflamasyonda ve ROS üretiminde artış, uyarı iletiminde bozulma ve kardiyak metabolizmada farklılaşmalar meydana gelir (Dandona ve ark., 2003). DKM'de Ang II inflamasyon, apoptozis ve ROS süreçlerinin artmasına da katkı sağlamaktadır (Westermann ve ark., 2007a; Westermann ve ark., 2007b; Zhou ve ark., 2008). Hücre düzeyinde Ang II/AT1R aktivitesinde artış DKM sürecinde APD süresinde bir artışa neden olmaktadır. Yapılan çalışmalara göre bu durumun nedeni  $I_{to}$  ve  $I_{K1}$  akımları üzerinde oluşan baskılanmadır (Raimondi ve ark., 2004). DKM'de uyarılmaya etki edebilen Ang II/AT1R sinyal iletimi, kasılma fonksiyonunu da değiştirmektedir. Bozulan kasılma fonksiyonunun nedeninin araştırılması sonucunda Ang II/AT1R sinyalinin hücre içi  $Ca^{2+}$  düzenlenmesini etkilediği bulgusuna ulaşılmıştır (Malhotra ve ark., 1997). Özellikle RYR ve FKB12.6 proteinlerini PKC aracılığıyla etkileyerek, SR  $Ca^{2+}$  içeriği,  $Ca^{2+}$  transienleri ve sızıntılar üzerine etki göstermektedir (Yaras ve ark., 2007).

Diyabetik kalplerde hipertrofi olmaksızın diyastolik fonksiyon bozukluğunun da tespit edilebildiği bildirilmiştir (Schannwell ve ark., 2002; Acar ve ark., 2009). Bu bilgiler birlikte değerlendirildiğinde diyabetik durumda hipertrofinin sıklıkla görülebildiği ancak gerekli olmadığı yorumu yapılabilmektedir.

DKM'de gerçekleşen bu olgulara, sistemik değişikliklerden bağımsız (kan basıncı gibi) sistolik ve diyastolik fonksiyon değişiklikleri eşlik etmektedir (Miki ve ark., 2013; Adeghate ve Singh, 2014). T1DM veya T2DM hastalarda, sol ventrikül diyastolik fonksiyon bozukluğu normal sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu mevcutken gözlenebilmektedir. Gözlenen diyastolik fonksiyon bozukluğu anormal

relaksasyon ve/veya yalancı normal dolum gibi transmitral sol ventrikül dolum örüntüsü değerlendirilerek (Poirier ve ark., 2001; Zabalgoitia ve ark. 2001), konvansiyonel ekokardiyografi ve doku doppler görüntüleme yöntemleri kullanılarak tespit edilebilen, erken safhalarda % 47-75 oranında meydana gelebilen bir olgudur (Boyer ve ark., 2004; Shivalkar ve ark., 2006). Diyabette görülme sıklığı diyastolik fonksiyon bozukluğu ile kıyaslandığında az olsa da, sistolik sol ventrikül fonksiyon bozukluğu da meydana gelmektedir (Andersen ve ark., 2003; Kosmala ve ark., 2004; Muranaka ve ark., 2009).

DKM'de en sık karşılaşılan durumlardan bir tanesi de fibrozis oluşumudur. STZ kaynaklı T1DM fare modelinde, diyabetin fibrozis oluşturduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 2012). Hücreler arası bölgede kollajenin birikimi sonuçta kalp fonksiyon bozukluğuna ve nihayetinde HF'ye neden olan miyokardın sertleşmesine yol açabilir. Ventrikül miyokardın iç, orta ve dış katmanlarında kollajen birikimi sertliğe yol açar ve böylece ventriküler fonksiyon bozukluğu meydana gelir (Regan ve ark., 1981). Kantitatif olarak, interstisyel fibroz alanı, kontrollere kıyasla STZ uygulanan sıçanlarda yaklaşık olarak %43,8 oranında artış göstermektedir (Wang ve ark., 2012).

DKM'de yapısal olarak gözlenen değişiklikler içerisinde interkale disklerin ve miyofibrillerin değişimleri de değerlendirilmektedir. DM'den muzdarip sıçanların kardiyomiyositlerinin interkale disklerinin yapısı, kontrol ile karşılaştırıldığında büyük ölçüde bozulmuştur (Adeghate, 1998). İnterkale diskler bitişik kardiyomiyositleri birbirine bağlar ve bir hücreden diğerine elektriksel uyarıların hızlı ve optimal iletimine izin verir. DM'li sıçanların ventriküler miyositlerinde görüldüğü gibi interkale diskte bir bozukluk, DM'li hastalarda yaygın olan zayıf iletim ve daha sonraki HF'nin oluşmasının nedeni olarak değerlendirilmektedir (Valensi ve ark., 2002; Pfister ve ark., 2011). Uzun süreli DM sonrasında kardiyak miyofibril kaybının gerçekleştiği bilinmektedir (Hsiao ve ark., 1987) ve bununla birlikte kardiyak miyofibriller ATPaz aktivitesinin de azaldığını unutmamak gerekir (Pierce ve Dhalla, 1981). Kalbin ana kasılma elemanı olan miyofibrillerde gerçekleşen fonksiyon bozukluğu ya da sayısal eksilme kalp debisinde azalmaya neden olurken, DM'li hastaların sağlıklı bireylere nazaran muhtemelen HF ile karşılaşma olasılıklarının yüksek olacağını da göstermektedir.

DM, pro-inflamatuvar bir durumdur (Diamant ve ark., 2005) ve bu durum DKM'nin gelişiminde inflamatuvar süreçlerin önemli derecede katkı sağlayabileceği gerçeğini göz önüne koymaktadır (Westermann ve ark., 2006; Westermann ve ark., 2007b; Rajesh ve ark., 2012). DKM'de artmış inflamasyon için önerilen diğer mekanizmalar ise oksidatif stresle ilişkilidir (Li ve ark., 2010; Jadhav ve ark., 2013; Monji ve ark., 2013). Fibrozis ve miyokard inflamasyonunu artıran moleküler mekanizmaların birçoğu pro-apoptotik sinyal yollarını veya nekroz sinyalizasyonunu aktive edebilir. Artmış hücre ölümleri, T1DM ve T2DM'li hastaların kalplerinde ve bu bozuklukların kemirgen modellerinde sıklıkla görülür ve hem apoptotik hem de nekrotik süreçleri içerir (Cai ve ark., 2002; Chowdhry ve ark., 2007; Huynh ve ark., 2013).

Ventriküler miyositlerin fonksiyonunu hücresel düzeyde anlatmada en önemli olgu uyarılma-kasılma çiftlenimi olarak düşünülebilir. DM kardiyomiyositlerde AP'yi,  $Ca^{2+}$  transientlerini, kasılma elemanlarının  $Ca^{2+}$  duyarlılığını,  $K^+$  akımlarını önemli derecede değiştirebilme kapasitesine sahiptir (Gallego ve Casis, 2001; Pereira ve ark., 2006, Lacombe ve ark., 2007; Gallego ve ark., 2009).

DM'den etkilenmiş kardiyomiyositlerde APD uzaması gözlenmektedir. Diyabet modellerinin çoğunda APD uzamasının  $I_{to}$ 'daki azalmadan dolayı kaynaklandığı gösterilmektedir (Gallego ve Casis, 2001; Lacombe ve ark., 2007; Gallego ve ark., 2009). Kv4.2 (voltaj bağımlı  $K^+$  kanalı) ekspresyonunun baskılanması, diyabetik kalpte  $I_{to}$  akımında azalmanın temelini oluşturur (Rozanski ve ark., 1998; Huang ve ark., 2002). Kv4.2 kanalının baskılanması bu kanalı oluşturan  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerinin ve bunlarla ilişkili olan proteinlerin düzenlenmesinden dolayı gerçekleştiği literatürde belirtilmiştir (Rozanski ve ark., 1998; Huang ve ark., 2002; Sugden ve Holness, 2006, Marionneau ve ark., 2008).  $I_{to}$ 'nun azalması interstisyel fibrozise ve ventriküler kontraktıl işlev bozukluğuna neden olan  $Ca^{2+}$  döngüsünde artışa ve kalsinörin aktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Sah ve ark., 2002).

DKM'de  $Ca^{2+}$  kanallarındaki değişimin bifazik olduğu görülmüştür. Diyabet başlangıç evresinde  $Ca^{2+}$  girişini teşvik ederken, sonraki safhalarda  $Ca^{2+}$  kanal yoğunluğunda azalma ve dolayısıyla  $Ca^{2+}$  akım yoğunluğunda azalmaya neden olmuştur. LCC'nin baskılanması  $Ca^{2+}$ 'un hücre içerisine girişini azaltarak APD'nin daha fazla uzamasını engellemek amacıyla gerçekleşen dengeleyici bir mekanizma

olarak düşünülmektedir (Pierce ve ark., 1983; Dhalla ve ark., 1998). Ancak bu durum istenmeyen sonuçlarla karşılaşılmasına neden olabilmektedir.  $\text{Ca}^{2+}$  transientlerinin tepe değerlerinin bazı çalışmalarda azalmasına rağmen (Lagadic-Gossmann ve ark., 1996; Belke ve ark., 2004a; Pereira ve ark., 2006; Lacombe ve ark., 2007; Yaras ve ark., 2007), bütün deneysel diyabet modellerinde bu değişim gözlenmemektedir (Ishikawa ve ark., 1999; Zhang ve ark., 2008; Howarth ve ark., 2011). Diyabetik kardiyomiyositlerde  $\text{Ca}^{2+}$  transientlerinin azalma süresindeki yavaşlama, teorik olarak sitozoldan  $\text{Ca}^{2+}$  uzaklaştırma oranının azalmasına dayandırılabilir (Ishikawa ve ark., 1999). Hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  düzenlenmesinde etkin rol oynayan SERCA2a proteininde azalma da bu bilgiyle tutarlılık göstermektedir (Belke ve Dillmann, 2004b). SERCA2a protein düzeyinde bir değişiklik olmasa da, bu pompanın enzimatik olmayan glukozilasyonunun pompanın fonksiyonunu değiştirdiği bilinmektedir (Bidasee ve ark., 2004). Bazı diyabet modellerinden elde edilen verilere göre de SERCA2a'nın işlevinde düzenleyici bir rolü olan fosfolamban proteininin fosforilasyonunda artma bulgusuna ulaşılmıştır (Shimoni ve ark., 2005; Pereira ve ark., 2006).  $\text{Ca}^{2+}$  çıkışını sağlayan başka bir  $\text{Ca}^{2+}$  düzenleyici protein olan NCX diyabetik kalplerde korunmaktadır (Zhang ve ark., 2008). Ancak diyabetik kalplerdeki  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaz aktivitesindeki baskılanmanın  $\text{Ca}^{2+}$  alımını teşvik ettiği, bunu da NCX'in ters modunun etkisi vasıtasıyla gerçekleştiği önerilmektedir (Pierce ve Dhalla, 1981; Takeda ve ark., 1996; Golfman ve ark., 1998). Öte yandan NCX ileri modunun aktivitesinin baskılanması  $\text{Ca}^{2+}$  atılmasını azalttığı, dolayısıyla da hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$ 'un arttığı söylenmektedir (Makino ve ark., 1987; Takeda, Dixon ve ark., 1996; Golfman ve ark., 1998). Ayrıca diyabetik kalpte  $\text{Ca}^{2+}$  pompa aktivitesi azaldığı için de kardiyomiyositlerden  $\text{Ca}^{2+}$  atılımı baskılanmaktadır (Makino ve ark., 1987; Takeda ve ark., 1996; Golfman ve ark., 1998). SR'dan  $\text{Ca}^{2+}$  sızıntısının artması da diyabetik kalplerdeki bir anormallik olarak bildirilmiştir.  $\text{Ca}^{2+}$  sızıntısının transjenik fare modeliyle oluşturulan diyabette arttığı ve bu artışın RYR'lerin bir düzenleyici faktörü olan FKBP12.6 düzeyinin azalmasıyla ilişkili olduğu ifade edilmiştir (Belke ve ark., 2004a). STZ ile indüklenen diyabetli sıçanların miyokardlarında hem RYR hem de FKBP12.6'nın %50 oranında azaltılmasıyla bağlantılı bir şekilde,  $\text{Ca}^{2+}$  kıvılcımları (sparks) olarak adlandırılan yerel  $\text{Ca}^{2+}$  salınımları %60 oranında artmaktadır (Yaras ve ark., 2005). İlginç olarak  $\text{Ca}^{2+}$  sparklarındaki artış ve RYR ile FKBP12.6'nın baskılanması, AT1R blokörü kandesartan kullanımıyla azaltılmıştır. Bu kullanım sızıntıların Ang II ve AT1R

ilişkili olabileceğini göstermektedir (Yaras ve ark., 2007). Fonksiyon bozukluğu olan RYR yoluyla oluşan  $Ca^{2+}$  sızıntısı ve SERCA2a aracılığıyla alınan  $Ca^{2+}$ 'da azalma diyabette SR  $Ca^{2+}$  deposunun azalmasından sorumlu gibi görünmektedir (Lagadic-Gossmann ve ark., 1996).

## **2.5. Diyabetik Kardiyomiyopati ve Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi İlişkisi**

RAAS'ın DKM'ye katkısı deneysel ve klinik çalışmalarla gösterilmiştir. Yüksek glukoz kardiyomiyositlerde (Singh ve ark., 2007) ve kardiyak fibroblastlarda (Singh ve ark., 2008b) hücre içi RAAS'ı düzenlemektedir. Bu nedenle DM, hücre içi RAAS'ın in vivo rolünü incelemek için önemli bir çalışma alanı sağlamaktadır. İn vitro çalışmalar, diyabetik kalpte kardiyomiyositlerin öncelikle renin ve kimaz yoluyla hücre içi Ang II üreteceğini, fibroblastların ise renin ve ACE yoluyla hem hücre içi hem de hücre dışı Ang II üreteceğini öne sürmektedir (Frustaci ve ark., 2000). Bu nedenle Ang II'nin, diyabetik kalbin hücreleri üzerinde hem intrakrin hem de otokrin / parakrin etkilere sahip olacağı düşünülmektedir. Dolayısıyla, ACE inhibitörleri sadece kardiyak fibroblastlarda Ang II sentezini önleyebilecektir. Bununla birlikte, anjiyotensin reseptör blokörlerinin (ARB), kalpteki hücre içi Ang II aracılı etkileri ortadan kaldıramayacağı bildirilmiştir (Baker ve ark., 2004). Bu nedenle, ACE inhibitörleri ve ARB'leri kullanan mevcut tedavi edici yöntemler DKM'de sadece kısmen etkili olabilmektedir. Artık, ARB'ler ve ACE inhibitörleri kullanarak RAAS'ın inhibisyonunun, beklenildiği kadar fazla kardiyovasküler yarar sağlamadığı konusunda artan bir fikir birliği oluşmaktadır (Turnbull ve ark., 2005; Weber ve Giles, 2006). Kardiyak hücre içi RAAS aktivasyonunun kardiyak yeniden şekillenmedeki rolünü incelemek için sıçanlarda STZ kaynaklı tip-1 diyabet modeli oluşturan bir çalışmaya göre diyabetik kalplerden izole edilen kardiyomiyositlerde kontrole nazaran hücre içi Ang II düzeylerinde ciddi bir artış gözlenmiştir. Hücre içi Ang II seviyeleri kandesartan tarafından düzeltilememiştir. Dolayısıyla da Ang II'nin hücre içi olarak sentezlendiği ve AT1R yoluyla içselleştirilmediği düşünülmektedir (Singh ve ark., 2008b). Bu gözlemler bir üst seviyeye, STZ kaynaklı diyabette renin, ACE ve AT1R seviyelerindeki inhibisyonların kardiyak fonksiyon çerçevesinde karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesiyle taşınmıştır (Yong ve ark., 2013). Elde edilen verilere göre, renin inhibisyonunun DKM'de ACE inhibitörleri ve ARB'lere kıyasla benzer ya da daha iyi kardiyak koruma sağladığı gösterilmektedir. ACE

inhibitörlerinin ve ARB'lerin koruyucu etkilerinin, kallikrein-kinin sistemi ve peroksizom proliferatör aktiviteli reseptör (PPAR) aktivasyonu gibi RAAS ile ilgili olmayan mekanizmalar aracılığıyla kısmen gösterilebileceği düşünülmektedir (Erdos ve ark., 2010; Rong ve ark., 2010).

Ang (1-7)'nin sistemik ve kardiyak doku üzerine olan olumlu etkileri göz önüne alındığında, patolojik süreçlerde yararlı etkilere sahip olduğu söylenebilmektedir. Bu bakış açısıyla diyabet kaynaklı kardiyomiyopati üzerine olan etkileri de merak konusu haline gelmiştir. Çünkü DKM olgusuna direkt etkisi olduğu bilinen Ang II'ye bağlı olan fonksiyonları engelleyebildiği farklı çalışmalarda açıkça ortaya konmuştur.

İnsanlarda yapılan çalışmada DKM'den muzdarip hastalarda sol ventrikül yeniden modellenmesi ve fonksiyon bozukluğuyla, plazmadaki Ang (1-7) konsantrasyonu arasında negatif korelasyon olduğu bulgusuna erişilmiştir (Hao ve ark., 2013). DKM'ye sahip T2DM'li deney hayvanlarında yapılan çalışmada ise uygulanan Ang (1-7)'ye bağlı olarak, hipertofinin, lipotoksisitinin, adipoz dokuda gözlenen inflamasyonun engellendiği ve diyastolik fonksiyon bozukluğunun geriletebildiği bulgusuna ulaşılmıştır (Mori ve ark., 2014). Aynı tip deney modelinde yapılan bir diğer çalışma DKM olgusu ile birlikte görülen pro-inflamatif sitokin artışının, hipertofinin, hücre apoptozunun, lipid birikiminin ve fibrozisin Ang (1-7) uygulaması sonucunda engellendiği, ayrıca DKM kaynaklı akciğer inflamasyonunda gerilediği bulgusuna ulaşılmıştır (Papinska ve ark., 2016). DKM koşullarında lipid metabolizmasını yönetmek daha da önemli bir hal almaktadır. Bu durumun değerlendirildiği bir çalışmada Ang (1-7) uygulamasının bu durumun yönetiminde etkili olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında DKM ile ortaya çıkan vazokonstrüktif, fibrotik ve proliferatif özellikleride geriletebilmiştir (Singh ve ark., 2011). DKM'nin oluşturduğu inflamatif, fibrotik ve oksidatif stres olgularının incelendiği bir başka çalışmada ise Ang (1-7)'nin ERK1/2 ve p38-MAPK sinyalini ve TGF- $\beta$ 1 ekspresyonunu engelleyip, ACE2 aktivitesini arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Dolayısıyla bu olgularda gerileme ve oluşan sol ventrikül yeniden modellenmesi ve fonksiyon bozukluğunda iyileşme sonuçları ortaya çıkmıştır (Hao ve ark., 2015). DKM'de ACE aktivitesinin artmasına bağlı olarak Ang II/AT1R yolağının regülasyonunda yükselme olduğu ve bu durumla birlikte miyokardiyal

kontraksiyonda ve koroner akışta bozulmanın gerçekleştiği bilinmektedir. Bu olgu NADPH oksidaz ile pozitif korelasyon göstermektedir. Bu çerçevede yapılan bir çalışmaya göre Ang (1-7) uygulaması dengeleyici olan kendi yolağını aktive ederken NADPH oksidaz aktivitesini baskılayabilecek olan prostoglandin aktivasyonunu da tetiklemiş ve miyokardiyal kontraksiyon ile koroner akışta düzelme bulgularına ulaşılmıştır (Yousif ve ark., 2012).

Hemodinamik açıdan da DKM'nin önemli değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. Sol ventrikül kontraksiyonu ve relaksasyonunda azalma, ayrıca sol ventrikül sistolik basıncında düşme en belirgin örnekler olarak karşımıza çıkmaktadır. AVE0991'in uygulanarak bu parametrelerin araştırıldığı çalışma gösteriyor ki, Ang (1-7) aktivasyonunun artırılması bu parametreleri kontrol seviyelerine çekerek kardiyoprotektif bir rol oynamaktadır (Ebermann ve ark., 2008).

Sadece Ang (1-7)'nin değil, aynı zamanda ACE2 aktivitesinin artırılması da DKM üzerine olumlu etkiler göstermektedir. ACE2 aktivasyonunun ACE2/ACE ve MasR/AT1R oranlarını DKM'de arttırdığı gösterilmiştir. Dolayısıyla AT1R ile ilişkili ERK1/2 fosforilasyonu ve kardiyak hipertrofi ve fibrozis artışına neden olan 5' adenosin monofosfat aktiviteli protein kinaz alfa (AMPK- $\alpha$ ) ve 5' adenosin monofosfat protein kinaz beta 1 (AMPK- $\beta$ 1) ekspresyon artışları engellenmiştir (Murca ve ark., 2012). Bir diğer DKM koşullarında ACE2 aktivasyon artışına bağlı yapılan çalışmada ise kollajen birikiminin engellenebileceği, dolayısıyla da sol ventrikül yeniden modellenmesinin ve fonksiyonunun geri kazanılabileceği gösterilmektedir. Çalışma ayrıca kollajen birikiminin ve TGF- $\beta$  üretiminin matrik-metalloproteinaz (MMP-2) aracılığıyla azaltıldığını da vurgulamaktadır (Dong ve ark., 2012).

Yukarıda bahsedilen bilgiler RAAS'ın önemli nörohormonal düzenleyici olduğunu göstermektedir. Özellikle lokal RAAS'ın patolojik koşullarda etkin rol oynaması kardiyak patolojilerin değerlendirilme sürecinde dikkat edilmesi gereken hususlar ortaya koymaktadır. Yapılan çalışmalar yeni RAAS'ın yararlı etkilerini belirtmiş ve tıropatik etkilerini ön plana çıkarmıştır. DKM koşullarında ACE2/Ang (1-7)/MasR yolağının patolojinin anlaşılmasında ve tıropatik davranışların üretilmesinde etkin olduğu gösterilmiştir. Ancak şu zamana kadar yapılan çalışmalar histolojik düzeyde inflamatif, fibrotik ve oksidatif stres ilişkisinin değerlendirildiği, biyokimyasal

düzeyde glukoz ve lipit metabolizmasının değerlendirildiği, organ düzeyinde ise kapsamlı bir hemodinamik ilişkinin incelenmediği bir seviyede gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte doku ve hücre fonksiyonlarının birbirleri ile olan bağlantısı birlikte değerlendirilmemiş, uyarılma-kasılma çerçevesinde uyarılabilir bir doku olan kardiyak dokunun elektrofizyolojik açıdan hücre düzeyindeki değişiklikleri göz önünde bulundurulmamıştır.

Bu noktada çalışmamızda bu eksikliğin giderilmesi amaçlanmıştır. Hipotezimiz doğrultusunda DKM koşullarında Ang (1-7)'nin etkileri elektrofizyolojik olarak uyarılma-kasılma düzleminde incelenecektir. Ayrıca doku-hücre fonksiyon bağlantısı kurulacak ve değişim süreçlerinin birbirlerini nasıl etkilediği ortaya konacaktır.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1 Deney Gruplarının Oluşturulması

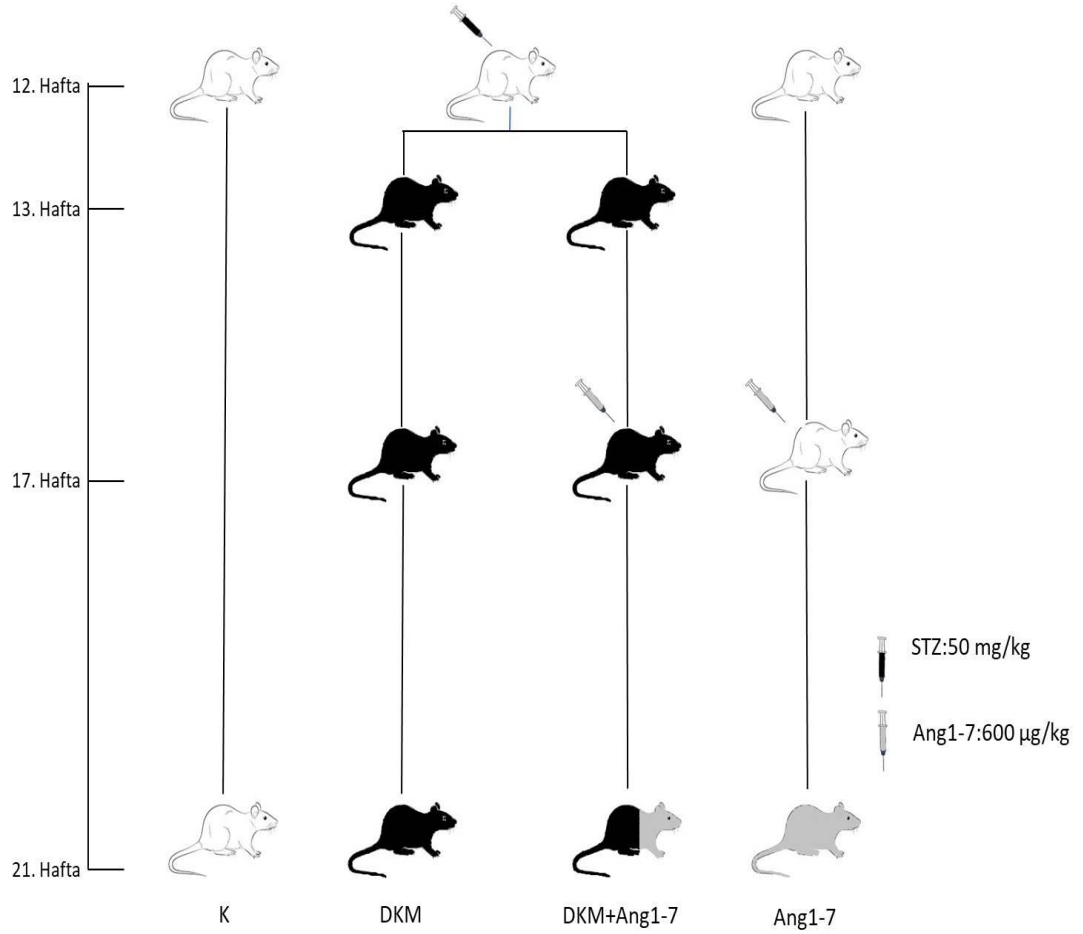
Çalışmamızda deneysel olarak oluşturulan DKM üzerine Ang (1-7) molekülünün etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda çalışmamızda deney hayvanı olarak toplamda 120 adet erkek *Wistar* sıçanlar kullanılmıştır. Deney hayvanları Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından üretilen deney hayvanlarından temin edilmiştir. Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (Karar No: 2017.01.04) tarafından belirlenmiş kurallara uygun şekilde barınma ve bakımı gerçekleştirilmiştir. İlgili deney hayvanlarının su ve yem kısıtlaması olmaksızın beslenmeleri sağlanmıştır.

Hipotezimiz doğrultusunda 3 aylık erkek *Wistar* sıçanlar kullanılmış ve ilgili deney hayvanlarıyla 4 adet deney grubu oluşturulmuştur. Bunlar;

- 1) Kontrol Grubu (K): Sıçanlar 8 hafta boyunca bakım altına alınmıştır. Bu süreç içerisinde enjeksiyon stresinin ortadan kaldırılması adına günlük 0.2 ml % 0.9'luk serum fizyolojik (SF) uygulaması gerçekleştirilmiştir.
- 2) Diyabetik Kardiyomiyopati Grubu (DKM): Sıçanlara, vücut ağırlıklarına göre 50 mg/kg dozunda streptozotisin (STZ) tek defaya mahsus intraperitoneal olarak uygulanıp diyabetik koşulların oluşması sağlanmıştır. Uygulamanın ardından 1 hafta sonra kan glukoz düzeyleri ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda 300 mg/dL değerinin altında olanlar deney dışı bırakılmıştır.
- 3) Diyabetik Kardiyomiyopati+Anjiyotensin 1-7 Grubu (DKM+Ang 1-7): Sıçanlara, vücut ağırlıklarına göre 50 mg/kg dozunda STZ tek defaya mahsus intraperitoneal olarak uygulanıp diyabetik koşulların oluşması sağlanmıştır. Uygulamanın ardından 1 hafta sonra kan glukoz düzeyleri ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda 300 mg/dL değerinin altında olanlar deney dışı bırakılmıştır. Bu değer üzerinde kan glukoz düzeyine sahip olan deney hayvanlarının 4 hafta boyunca bakımları gerçekleştirilmiştir. Diyabetik kardiyomiyopatinin gelişimini takiben 4 hafta boyunca her gün günlük 600 µg/kg dozda subkutan olarak Ang (1-7) uygulaması gerçekleştirilmiştir.

4) Anjiyotensin 1-7 Grubu (Ang 1-7): Sıçanların, 5 haftalık bakımları gerçekleştirildikten sonra, 4 hafta boyunca 600 µg/kg dozunda Ang (1-7) molekülü subkutan olarak uygulanmıştır.

Tüm deney gruplarında, hayvanlar deneysel takvime uygun olarak 5 aylık olduklarında deneysel işlemlere tabi tutulmuştur (Şekil3.1).



**Şekil 3.1.** Oluşturulan deney gruplarının şematik gösterimi.

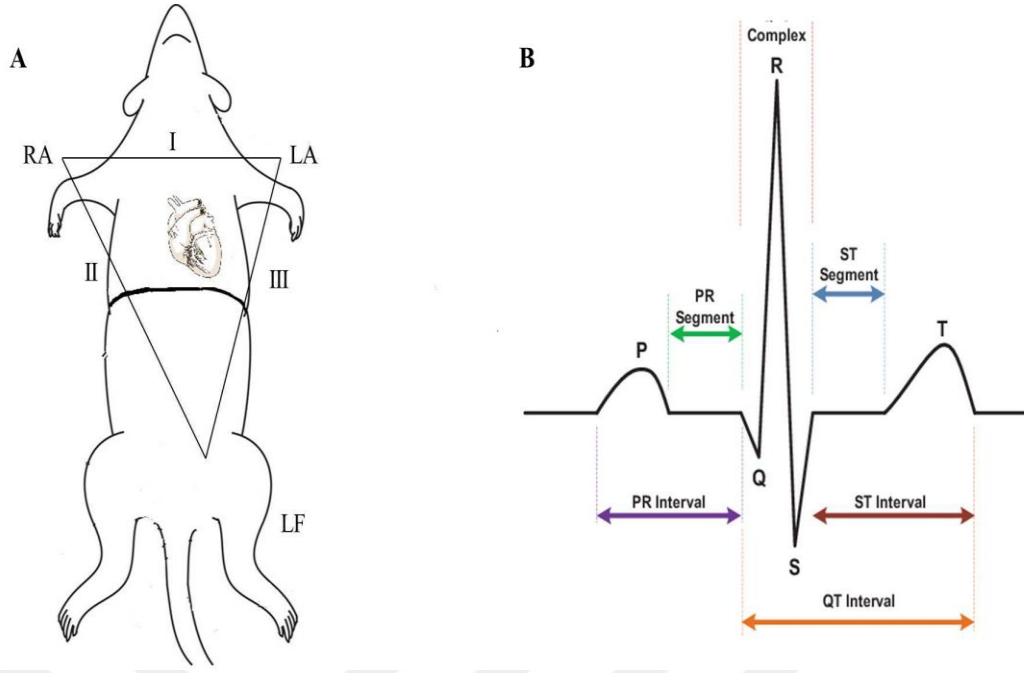
Deneysel işleme tabi tutulan bütün deney hayvanlarının başlangıç ve son vücut ağırlıkları, başlangıç ve son kan glukoz düzeyleri ile kalp ağırlıkları, akciğer ağırlıkları ve tibia uzunlukları ölçülmüştür. Bu sayede deney hayvanlarının makro anatomik ve genel durumlarıyla ilgili bilgiler elde edilmiştir.

### 3.2 Kan Basıncı Ölçümleri

Deney hayvanlarının kan basıncı ölçümü kuyruk arterlerinden elde edilmiştir. Ölçüm izofloran inhalasyon anestezisi altında deney hayvanının hareket etmemesi sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Ölçüm manşonu deney hayvanının kuyruk kökünden 1 cm aşağısına yerleştirilmiştir. Manşon basıncının artmasıyla arter kan akışının kesilmesi ve basıncın azalmasıyla tekrardan akışın başlaması sürecinde, arter basıncı manşona bağlı bir ışık kaynağından gönderilen ve toplanan ışık şiddetindeki değişimin hesaplanmasına bağlı olarak elde edilmiştir. Sinyaller MP 150 veri toplama sistemi (BIOPAC; ABD) ve MAY-BHPR 9610-PC (Commat; TR) ünitesi kullanılarak toplanmış ve bilgisayara aktarılmıştır. Sinyal analizleri Acknowledge3.8 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar sistolik, diyastolik ve ortalama kan basıncı (mmHg) olarak verilmiştir.

### 3.3. Elektrokardiyografi Ölçümleri

Deney takvimine uygun olarak madde uygulamaları ve bakımları sonlanan deney hayvanları deneysel işleme alınmadan önce deney hayvanlarının EKG ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanları orta derece izofloran inhalasyon anestezisi altında hareket etmesi engellenerek elektrotlar yerleştirilmiştir. EKG sinyalleri Einthoven üçgeni prensibi çerçevesinde (Şekil 3.2.) I. derivasyondan kaydedilmiştir. Bunun için deney hayvanlarının sağ ön ayak deri altına negatif kutup elektrotu, sol ön ayak deri altına pozitif kutup elektrotu ve sol arka ayak deri altına da toprak elektrotu yerleştirilmiştir. EKG sinyalleri MP 150 veri toplama sistemi ve bu sistemin parçalarından biri olan EKG modülü (BIOPAC; ABD) ile toplanmıştır. Toplanan sinyaller Labchart7.0 (ADInstruments; ABD) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Sinyal analizi sonucunda kalp hızı, P-R intervali, P dalgasının süresi, QRS intervali, Q-T intervali, QTc, T dalgasının süresi, P ve QRS dalgalarının genlik değerleri hesaplanmıştır.

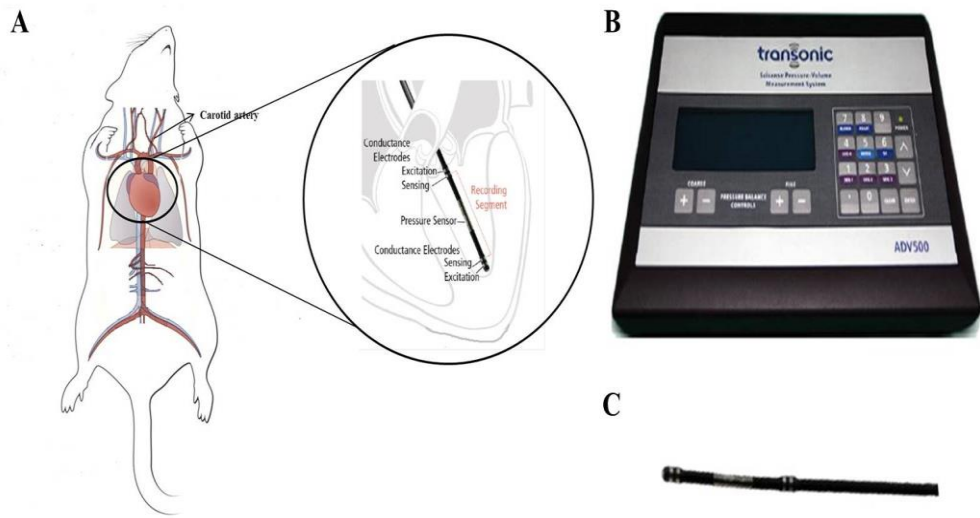


**Şekil 3.2.** Elektrokardiyografi ölçüm yönteminin prensibi ve temel EKG dalgasının şematik gösterimi. A) Einthoven prensibi çerçevesinde deney hayvanlarına kayıt elektrotlarının yerleştirilme şekli. Çalışmamızda kayıt I. derivasyondan alınmıştır. B) EKG dalgasının bileşenlerinin gösterimi.

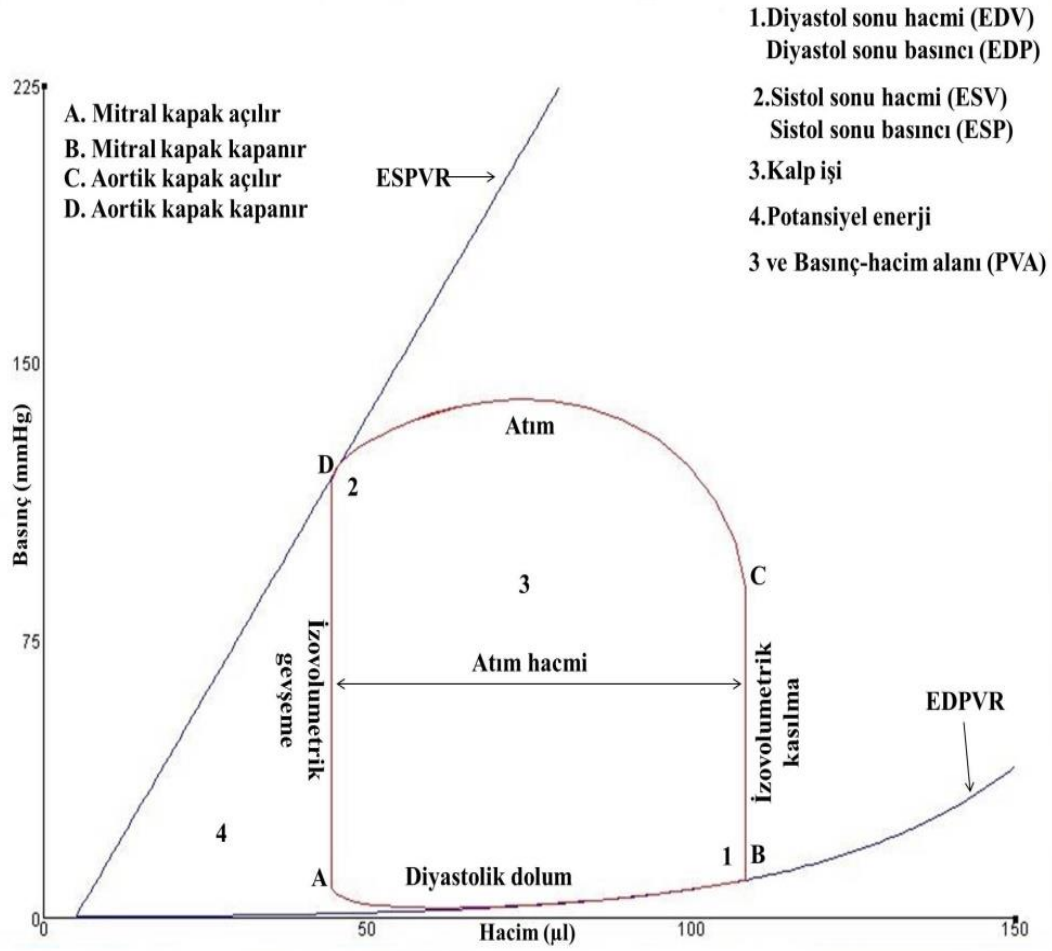
#### 3.4. Hemodinamik (Basınç-hacim döngüsü) Parametrelerin Ölçümleri

Hipotezimiz çerçevesinde kardiyak dokunun organ düzeyindeki fonksiyonlarını değerlendirebilmek için hemodinamik ölçümler yapılmıştır. Hemodinamik değerlendirmeyi yapabilmek için sol ventrikül basınç-hacim ilişkisi incelenmiştir. Bu ölçüm yöntemi invaziv bir yöntemdir ve cerrahi prosedüre uygun olarak yapılmıştır. Mekanik ventilatör hem izofloran inhalasyon anestezisi (başlangıç konsantrasyonu % 4, idame konsantrasyon % 2) uygulanmasını hem de işlem sırasında göğüs içi basıncın normal fizyolojik koşullar çerçevesinde olmasını sağlamıştır. Bu sayede sol ventrikül basınç-hacim ilişkisinin fonksiyonu gerçek zamanlı olarak fizyolojik koşullar altında ölçülebilmektedir. Anestezi altına alınan deney hayvanı boyun bölgesi temizlenmiş, deri ve kas dokusu disekte edilerek internal karotis arter cerrahi alan içerisinde açığa çıkarılmıştır. Bu işlemi takiben internal karotis arterine ölçümü yapacak kataterin girişini sağlayabilecek ufak bir kesi atılmıştır. Katater bu kesinin açtığı boşluktan internal karotis artere gönderilmiştir. Katater ilerletilerek önce karotis artere, oradan genel karotis artere, sonrasında aortik arkı geçerek aortun sol ventrikülden çıkış yaptığı aort kapakçıklarına kadar iletilmiştir. Sol ventrikül içerisine giriş yapabilmek için bu noktada katatere rotasyon hareketleri yaptırılmış ve aort kapakçıklarına zarar vermeden sol ventrikül içerisine giriş yapılmıştır. Bu

sürecin hasarsız ve doğru yapılabilmesi için kullanılan programdaki basınç, hacim, faz ve büyüklük değerlerinin değişimleri dikkatli bir şekilde incelenerek hareket edilmiştir. Bu işlemler sorunsuz bir şekilde geçildikten sonra ölçümün yapılabilmesi ve kayıtların gürültü derecesinin en aza indirilebilmesi için kataterin uç kısmı kalbin apeks kısmına değmeden hemen o bölgenin üzerinde bir yere sabitlenmiş ve diğer çevreçlerin sol ventrikül duvarlarına değmemesi sağlanacak şekilde pozisyon aldırılmıştır. Bu ölçümler için ADV500 (Transonic; ABD) basınç-hacim ölçüm sistemi ve deney hayvanı olarak sıçan modellerine uygun 1.9F'lik 4 hacim ve 1 basınç çevreçine sahip katater (Transonic; ABD) kullanılmıştır (Şekil 3.3). Kayıtlar Acknowledge 3.8 programı aracılığıyla kaydedilmiş ve Labchart7.0 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler sonucunda atım işi (SW), kalp debisi (CO), atım hacmi (SV), maksimum hacim (Vmax), minimum hacim (Vmin), sistol sonu hacmi (ESV), diyastol sonu hacmi (EDV), maksimum basınç (Pmax), minimum basınç (Pmin), sistol sonu basınç (ESP), diyastol sonu basınç (EDP), ejeksiyon fraksiyonu (EF), kardiyak verim (CE), arteriyel elastans (Ea), basınç-hacim alanı (PVA), potansiyel enerji (PE), tau ( $\tau$ ) ve birim zamandaki maksimum basınç değişimi (dP/dt) parametreleri değerlendirilmiştir.



**Şekil 3.3.** Basınç-hacim ölçümünün şematize gösterimi. A) İnvazif girişimin ve kataterin yerleşiminin, B) ADV500 ve C) 1.9F büyüklüğe sahip sıçanlar için kullanılan hemodinamik kataterin gösterimi.



**Şekil 3.4.** Sol ventrikül basınç-hacim ilişkisinin bir döngüsü sırasında gerçekleşen durumlar ve hesaplanan parametrelerin gösterimi. EDPVR: Diyalistol sonu basınç-hacim ilişkisi, ESPVR: Sistol sonu basınç-hacim ilişkisi.

### 3.5. Kardiyomiyosit İzolasyonu

Tek hücre ventrikül kardiyomiyositlerle elektrofizyolojik çalışmaların yapılabilmesi için öncelikle deney hayvanlarının kardiyak dokusunun izolasyonunun gerçekleştirilmesi gerekmektedir. 30 mg/kg dozunda sodyum pentabarbütal kullanılarak deney hayvanları dış uyaranlara cevap vermeyecek düzeyde anestezi altına alınmıştır. Akabinde deney hayvanının göğüs bölgesi temizlenmiş ve kostaların da ekarte edilmesiyle göğüs kafesi açılmıştır. Kardiyak doku deney hayvanından çıkartılarak ters perfüzyon ilkesi çerçevesinde Langendorff sistemine bağlanmıştır. İlk önce %5 CO<sub>2</sub>-%95 O<sub>2</sub> bileşiminden oluşmuş bir karışım ile gazlanarak pH değeri 7.35'de dengelenmiş, içeriği (mM): 137 NaCl; 5,4 KCl; 0,5 MgCl<sub>2</sub>; 1,8 CaCl<sub>2</sub>; 11,8 HEPES; 10 glukoz olan kalsiyum superfüzyon solüsyonuna (Tyrode) 1-2 dk arasında maruz bırakılarak kalp içerisinde kalmış olan kan ya da

doku parçalarının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu işlemin ardından kalpten içeriği (mM): 137 NaCl; 5,4 KCl; 1,2 MgSO<sub>4</sub>; 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5,8 HEPES; 20 glukoz olan pH değeri 7,2 olarak sabitlenen Ca<sup>2+</sup> bulunmayan perfüzyon solüsyonu 3-5 dk süresince geçirilerek kalbin Ca<sup>2+</sup>dan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu işlem Ca<sup>2+</sup> ile aktivitesi artan kollojenaz enziminin aktivitesinin istenilen düzeyde olmasını sağlamak için yapılmıştır. Enzimatik perfüzyon için 0,5 mg/ml kollajenaz (collagenase A, Worthington) ve 0,03 mg/ml proteaz kullanılarak oluşturulan karışımın 30-40 dk süresince kalbin içerinden devir daim yapması sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Fiziksel olarak uygun kıvama gelen kardiyak doku Ca<sup>2+</sup> bulunmayan perfüzyon solüsyonunun içerisine alınmıştır. Burada atriyumlar ve sağ ventrikül makas yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Sıvı ortamın içerisinde sadece sol ventrikülün kalması sağlanmıştır. Bu işlemi takiben ortam içerisindeki sol ventrikül cerrahi makas yardımıyla küçük parçalara ayrıştırılmıştır. Daha küçük parçalara ayrılmış sol ventrikülün solüsyon içerisinde iyice çözünmesini sağlamak amacıyla pastör pipeti kullanılarak pipetleme işlemi gerçekleştirilmiş ve görece homojen bir karışım elde edilmiştir. Pipetleme işleminin de sonrasında çözünmeyen parçaları ayıklamak adına solüsyonumuz filtreden geçirilerek Ca<sup>2+</sup> bulunmayan bir ortam içerisine alınmıştır. Ca<sup>2+</sup> bulunmayan solüsyonla tekrardan bir yıkama daha yapılmasının ardından final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonu kademeli olarak arttırılmıştır. Sonuç olarak tek hücre kardiyomiyositleri elde edilmiş ve fizyolojik koşullar çerçevesinde fonksiyonlarını gerçekleştirebilecekleri bir ortam içerisinde bulunmaları sağlanmıştır.

### 3.6 Aksiyon Potansiyeli Ölçümleri

Tyrode solüsyonu içerisinde bulunan tek hücre kardiyomiyosit, içeriği (mM): 120 K-aspartat; 10 NaCl; 20 KCl; 10 HEPES; 5 MgATP ve pH 7,2 olan pipet solüsyonun bulunduğu 2-3 MΩ büyüklüğünde dirence sahip elektrot ile "Gigaseal" durumuna getirilmiştir. Pipet ile hücre zarı arasında kaynaşma sağlandıktan sonra negatif ve pozitif basınç değişimleri uygulanarak hücre zarı kırılmış ve pipet ile hücre içinin elektriksel iletkenliği sağlanmıştır. Bu işlemlerin ardından patch-clamp amfisinin akım kenetleme moduna geçilerek hücrenin belirlediğimiz yani dinlenme zar potansiyelinde sabitlenmesi gerçekleştirilmiştir. Kenetlenen kardiyomiyosite voltaja bağımlı Na<sup>+</sup> kanallarının açılıp Hodgkin çevirimine girmesini sağlayarak AP'nin ateşlenmesine öncülük edecek olan eşik değerin geçilmesi için 4 ms süreli 10 nA

kare akım uygulanmıştır. Sinyaller 20 kHz örneklem frekansındadır ve 5 kHz low-pass filtreden geçirilmiştir. AP oluşturabilen hücrelerden 1 Hz frekansında AP sinyalleri Pclamp (Axon, ABD) programı aracılığıyla kaydedilmiştir. Alınan kayıtlardan Clampfit programı kullanılarak AP'nin dinlenme zar potansiyeli, genliği, tepe noktası değeri, tepeye çıkış süresi ve repolarizasyon süresi analiz edilmiştir.

### 3.7 Voltaja Bağımlı Potasyum Kanal Akımı Ölçümleri

Tyrode solüsyonu içerisinde bulunan tek hücre kardiyomiyositler içeriği (mM): 120 KCl; 6,8 MgCl<sub>2</sub>; 5 Na<sub>2</sub>ATP; 5 fosfokreatin; 0,4 Na<sub>2</sub>GTP; 10 EGTA; 4,7 CaCl<sub>2</sub>; 20 HEPES ve pH 7,2 olan pipet solüsyonunun 2-2,5 MΩ büyüklüğündeki elektrotlar ile "Gigaseal" durumu oluşturulmuştur. Ayrıca, Ca<sup>2+</sup> akımlarını bloke etmek amacıyla kapiller boru ile perfüzyon solusyonuna 0,25 mM CdCl<sub>2</sub> eklenmiştir. Pipet ile hücre zarı arasındaki kaynaşma sağlandıktan sonra, negatif ve pozitif basınç değişimleri ya da 0,5-1 V'luk pulslar uygulanarak hücre zarı kırılmış ve pipet ile hücre zarının tek bir elektriksel devre olarak davranması sağlanmıştır. Bu birliktelik oluştuktan sonra giriş direncinin 5 MΩ altında olması sağlanarak ölçülen akımın en doğru düzeyde algılanması sağlanmıştır. Elektriksel değişimleri uyguladığımız ve kontrol ettiğimiz patch-clamp amfisi voltaj kenetleme modunda kullanılmıştır. Tek hücre kardiyomiyositleri bu sayede tüm-hücre konfigürasyonunda akım ölçümleri için hazır hale getirilmiştir.

Gigaseal oluşumu ve kenetleme sağlandıktan sonra zar potansiyeli -80 mV düzeyinde tutulan hücrelere 600 ms'lik pulslar 7 s'lik aralıklarla ve 10 mV'luk basamaklar şeklinde -120 mV'tan +70 mV'a kadar 14 defa uygulanmıştır. Patch-clamp amplifikatörünün voltaj kenetleme modunda 5 kHz'lik alçak geçiren filtreden geçirilen potasyum akımları, 10 kHz'lik örnekleme hızında bilgisayar yazılımı ile kaydedilmiştir. Akımların tepe değerinden 600 ms'lik pulsun son bölümündeki akım değerleri ( $I_{ss}$ ) çıkarılarak geçici dışa doğru potasyum akımları ( $I_{to}$ ) hesaplanmıştır. -120 mV'tan -50 mV kadar olan akımların ortalama değerleri ölçülerek ( $I_{K1}$ ) elde edilmiştir. Her potansiyel için elde edilen akım değerleri hücreler arası büyüklük değişiminden kaynaklanabilecek sapmaları önlemek amacıyla ölçüm yapılan hücrenin sığasına bölünerek değerlendirilmiş ve tüm akım değerleri akım yoğunluğunun voltaja göre değişimi (pA/pF) olarak verilmiştir.

Kanalların inaktivasyon kinetiğini incelemek için  $-80$  mV'a kenetlenen hücre zarı  $50$  ms boyunca  $-50$  mV'ta tutulduktan sonra,  $-70$  ile  $+60$  mV'lar arasında  $10$  mV'luk adımlarla prepuls uygulanmış ve her adımı takiben tekrar  $-80$  mV seviyesinde  $3$  ms beklemiş,  $+70$  mV'luk ve  $500$  ms süreli ikinci bir puls uygulanmıştır. Ardından ortalama değerler hesaplanarak Boltzmann denkleminde uydurulmuştur.

$$(I/I_{max} = [1 + \exp(V_m - V_{1/2})/k]^{-1})$$

Akımların reaktivasyonları da iki aşamalı bir protokole göre kaydedilmiştir:  $-80$  mV'taki zar potansiyeli  $400$  ms süreyle  $+70$  mV'a kenetlenip tekrar başlangıç potansiyeline döndükten sonra  $20$  ms bekleyip aynı şekildeki ikinci puls uygulanmıştır.  $\Delta t = 5$  ms olmak üzere aynı protokol  $300$  ms'ye kadar uygulanmış ve her adımda ölçülen akımın tepe değeri maksimum akım değerine oranlandıktan sonra zamana göre % reaktivasyon hesaplanmış ve üssel fonksiyona uydurulmuştur.

$$(I/I_{max} = [1 - \exp(-t/\tau)])$$

Kanalların kinetik analizleri de yapılarak üssel fonksiyondan reaktivasyon parametreleri elde edilerek gruplar arasındaki farklar incelenmiştir.

### 3.8 Voltaja Bağımlı Kalsiyum Kanal Akımları ve Eş Zamanlı Hücre İçi Geçici Kalsiyum Değişimi (Transient) Ölçümleri

Tyrode solüsyonu içerisinde bulunan tek hücre kardiyomiyositler içeriği (mM):  $110$  Cs-aspartat;  $20$  CsCl;  $1,0$  MgCl<sub>2</sub>;  $5$  fosfokreatin;  $5$  Na<sub>2</sub>ATP;  $0,05$  Fura-penta potasyum ve  $5$  HEPES pH  $7,4$  olan pipet solüsyonunun  $2-2,5$  MΩ büyüklüğündeki elektrotlar ile "Gigaseal" durumunun sağlanmasını takiben tüm-hücre konfigürasyonu oluşturulmuştur. Kayıt için önce hücreler  $-80$  mV düzeyinde kenetlenmiş ve eğimli bir voltaj uygulaması ile zar potansiyeli  $-45$  mV'a kenetlenmiştir. Bu seviyede bir süre beklenerek voltaja bağlı Na<sup>+</sup> kanalları inaktif hale getirilmiştir. Sonra  $-60$  mV'tan  $10$  mV'luk artışlarla  $+80$  mV'a  $300$  ms'lik depolarize edici pulslar uygulanarak  $14$  farklı voltaj seviyesinde kayıtlar alınmış ve bilgisayara kaydedilerek analiz edilmiştir. Tepe değerleri ölçülüp  $200$  ms'nin sonundaki kuyruk akımlarından çıkarılarak I<sub>CaL</sub> elde edilmiştir. Hücre büyüklüğünden dolayı kaynaklanabilecek sorunları engellemek için elde edilen akım değerleri kapasitansa bölünerek akım yoğunluğu (pA/pF) olarak verilmiştir. Bununla birlikte yukarıda bahsedilen protokol uygulanırken I<sub>CaL</sub> ile eş zamanlı olarak her bir

potansiyel düzeyi için akıma karşılık oluşan  $\text{Ca}^{2+}$  transientleri Fura-2'nin 340 ve 380 nm'de eksite edilerek 510 nm'ye merkezlenmiş floresan oranların ölçülmesi ile kaydedilmiştir. Kaydedilen transient sinyalleri Ionwizard 6.0 programıyla analiz edilmiştir. Analiz sonucunda transientin genlik parametresi ( $\Delta F_{340/380}$ ) değerlendirilmiştir.

### 3.9 Bazal ve Geçici Hücre İçi Kalsiyum Değişimi (Transient) Ölçümleri

İzole edilen kardiyomiyositler fura-2 AM (4  $\mu\text{M}$ ) ile oda sıcaklığında 45-50 dakika inkübe edildikten sonra, 340 ve 380 nm'de eksite edilerek 510 nm'ye merkezlenmiş floresan oranların ölçülmesi ile  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  hesaplanmıştır. Hücre içi serbest  $\text{Ca}^{2+}$  ölçüm deneylerinde kullanılan banyo çözeltisinin içeriği şu şekildedir (mM): 130 NaCl; 4,8 KCl; 1,2  $\text{MgSO}_4$ ; 1,5  $\text{CaCl}_2$ ; 1,2  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 10 HEPES ve 10 glucose (pH= 7,4). İki ucuna elektrot yerleştirilmiş küvet içine alınan hücrelerden uyarılabilir olanı seçilerek bir pencere içine alınmıştır. Önce pencere banyonun hücre bulunmayan bir bölgesine odaklanarak belli bir süre kayıt alınıp hücre içi sinyalden çıkarılmıştır. Böylece banyo ortamının floresansından kaynaklanabilecek gürültünün ortadan kaldırılması sağlanmıştır. Bu sürecin sonrasında kardiyomiyosit pencere içerisine alınmış ve 20 s'lik bazal  $\text{Ca}^{2+}$  sinyali kaydedilmiştir, sonra hücreler 5-10 V'luk pulslar ile 1 Hz frekansında uyarılarak 200 s süreyle geçici hücre içi  $\text{Ca}^{2+}$  değişimleri ( $\text{Ca}^{2+}$  transient) kaydedilmiştir. Gözlenecek  $\text{Ca}^{2+}$  değişimine ait sinyallerin ölçümü Ionoptix marka (IonOptix, Milton, ABD) mikrospektroflorimetre ile yapılarak bilgisayar programı yardımıyla bilgisayara kaydedilip değerlendirilmiştir. Transientlerin kinetik analizi hesaplama programı ile hazırlanan bir analiz algoritması ile gama dağılım fonksiyonuna uydurularak gerçekleştirilmiştir. Her hücre 200 s süresince kaydedilen transientlerin parametrelerinin ortalamasından elde edilen değer ile temsil edilmiştir. Analizler sonucunda bazal  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , dökülen  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\Delta F_{340/380}$ ), tepeye çıkış süresi (TP) ve maksimum değer bazal duruma dönüş eğrisinin  $\tau$  değeri karşılaştırılmıştır.

### 3.10 Sodyum-Kalsiyum Değiş tokuşçu Akımı ve Kafein İndüklü Kalsiyum Değişimi (Transient) Ölçümleri

Tek hücre kardiyomiyositleri içeriği (mM): 110 Cs-aspartat; 20 CsCl; 1,0  $\text{MgCl}_2$ ; 5 fosfokreatin; 5  $\text{Na}_2\text{ATP}$ ; 0,05 Fura-penta potasyum ve 5 HEPES pH 7,4 olan pipet solüsyonunun 2-2,5  $\text{M}\Omega$  büyüklüğündeki elektrotlar ile "Gigaseal" durumuna

getirilmiştir. Pipet ile hücre zarın arasındaki kaynaşma sağlandıktan sonra, negatif ve pozitif basınç değişimleri ya da 0,5-1 V'luk pulsar uygulanarak hücre zarı kırılmış ve pipet ile hücre zarının tek bir elektriksel devre olarak davranması sağlanmıştır. -70 mV'a kenetlenen hücreler, 0 mV'a 10 kere kenetlenerek SR'ın  $Ca^{2+}$  ile tam dolumu gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından kapiller borular aracılığıyla 10  $\mu$ M'lık kafein bulunan  $Ca^{2+}$  bulunan dış solüsyonu 10 saniye boyunca kardiyomiyositlerin üzerine uygulanmıştır. Bu işlemin sonucunda kafein tarafından oluşturulan  $Ca^{2+}$  transientleri (SR içeriği) ve NCX'in içe doğru hücre zarı akımı ( $I_{NCX}$ ) eş zamanlı olarak kaydedilmiştir. Elde edilen akım sinyalleri Clampfit programında analiz edilerek ve hücre büyüklüğü değişkeninin ortadan kaldırılması için kapasitansa bölünerek  $I_{NCX}$  (pA/pF),  $I_{NCX}$  (pA\*ms/pF) ve  $I_{NCX}\tau$  parametreleri değerlendirilmiştir. Eş zamanlı olarak kaydedilen kafein transientleri de Ionwizard programında analiz edilmiş ve transient genliği ( $\Delta F_{340/380}$ ) ve transient  $\tau$  değerlendirilmiştir. Transientin  $\tau$  değeri 0 mV'daki  $Ca^{2+}$  değişiminden elde edilen  $\tau$  değerinden çıkartılarak SERCA2a aktivitesi hesaplanmıştır.

### 3.11 Kontraktil Parametre Ölçümleri

İzole edilen hücreler içinden tyrode solüsyonu geçen ve iki ucunda elektrot yerleştirilmiş kuvvet içine alınmıştır. Bu hücrelerden uyarılabilir olanlar seçilerek, 1 Hz frekanslı 5 V ve 4 ms'lik alan uyarıları uygulanmıştır. Uygulama sonucunda meydana gelen değişimler inverted mikroskoba monteli hızlı bir kamera yardımıyla (IonOptix; ABD) kaydedilmiştir. Elde edilen sinyaller Ionwizard programında analiz edilmiş ve dinlenim sarkomer boyu ( $\mu$ m), % kasılma oranı ( $L/L_0$ ), kontraksiyon süresi %90 ve relaksasyon süresi %90 parametreleri değerlendirilmiştir.

### 3.12 Protein Tayini

Deney hayvanlarından toplanan ve -20°C'de saklanan kardiyak dokular önce ağırlıkları tartılarak deney gruplarına göre ortalama kalp ağırlıkları belirlenmiştir. Sonra içeriği (mM): 20 TRİS-HCL pH 7,4; 150 NaCl; 2 KCl; 2 EDTA; 0,5 DTT; 100 Protez inhibitörü; 1  $Na_3VO_4$ ; 20 NaF; 1 EGTA; %2 NP-40 Tergitol; 0,4 PMSF; %1  $C_{24}H_{39}NaO_4$  olan homojenizasyon tamponu içerisinde +4 °C'de homojenizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Homojenizasyon sonrasında 10.000 G'de 30 dk santrifüj edilmiş ve süpernatantları toplanmıştır. Santrifüj işlemi sonrası örnekler içerisindeki protein miktarının ölçümüne geçilmiştir. Protein tayini Bradford yöntemi

kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu sürecin başında standart eğrimizin hesaplanabilmesi için 0, 2, 4, 8, 12, 16 ve 20 µg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde okumalar yapılmıştır. Bu işlemi takiben her deney grubumuz için oluşturulan homojenizasyon tamponu ve dokudan oluşan karışımlarımız çalışılmış ve standart eğrisi kullanılarak örneklerin protein seviyeleri tespit edilmiştir. Tespit sonucunda birim hacim (mL) içerisinde bulunan protein miktarımız (µg) belirlenmiştir.

### **3.13 Western-Blot Ölçümleri**

İçerisinde 40 µg protein olacak şekilde hazırlanan homojenatlarımız %8-12'lik SDS-PAGE jel içerisine yüklenerek 150 V'da 2,5 saat süresince yürütülmüştür. Yürüme işlemi biten jel transfer kasetlerinin içerisine alınarak 20 dk boyunca 1,5 A, 25 V'ta membrana transfer olması sağlanmıştır. Transfer işlemi biten membranlarımızı TTBS'de yıkadıktan sonra 1 saat süresince süt tozu ile bloklama işlemine tabi tutulmuştur. Bloklama işlemi takiben ilgili primer antikorlar eklenmiş ve membranın 2-3 saat boyunca hafif hızda çalkalanması sağlanarak beklenmiştir. Membran TTBS (Tween tris-buffered saline; 20mM Tris, 150mM NaCl ve % 0,1'lik Tween20) ile 3 kez yıkanmış ve sonrasında 1 saatte sekonder antikor ile hafif hızda çalkalanması sağlanarak beklenmiştir. Sekonder antikorlama işlemi sonrasında 15 dk'lık bir TTBS yıkaması daha gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi bittikten sonra karanlık oda da ECL (BIO RAD, ABD) kullanılarak filme aktarım yapılmıştır. Çalışmamız dahilinde RYR, SERCA, PLB, LVCC, Kv4.2, NCX, AGT1R, MASR, ACE, ACE2, PKA, CaMKII, PKC ve PLC protein seviyeleri ölçülmüştür. Ayrıca pRYR, pPLB, pPKA, pCaMKII protein seviyeleri de çalışılmıştır. Filme alınan görüntüler ImageJ (NIH, ABD) programında analiz edilmiştir.

### **3.14 Enzim Aktivitesi Ölçümleri**

Protein tayini ve standart eğrisi oluşturulduktan sonra içerisinde en fazla 2 µg protein bulunan 10 µl'lik solüsyonlar ve seyreltilmiş ACE solüsyonu 10 µl hacminde kuyucuklara yüklenmiştir. Ayrıca arka plan kontrolü için liziz tamponu ve pozitif kontrol için de 5 µl pozitif kontrol ve 95 µl ACE 1 dilüsyon tamponundan oluşturulmuş karışım da ayrı birer kuyucuğa yüklenmiştir. Son olarak 47 µl ölçüm tamponu ve 3 µl ACE substratından oluşan ACE substrat karışımı da bütün kuyucuklara yüklenmiştir. Yükleme işlemleri bittikten sonra 37°C'de 2 saat süreyle her 10 dk'da bir eksitasyon 330 emisyon 340 nm dalga boyunda kinetik okumalar

yapılmıştır. Elde edilen doğrusal grafik üzerinden iki adet zaman noktası seçilmiş ve bu zaman noktalarına karşılık gelen floresans değerleri belirlenmiştir. Bunlardan eğim hesabi yapılmıştır. ACE aktivitesi hesaplamak adına elde edilen değerler

$$A_{ACE1} = B \cdot D / (\Delta T \cdot P)$$

bağıntısı kullanılarak ACE 1 aktivitesi (BIOVISION; ABD) hesaplanmıştır. ACE 2 aktivitesi ölçümü içinde aynı prosedür ve hesaplama şekli kullanılmıştır.

### 3.15 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda deney gruplarını oluştururken diyabetik koşulları oluşturmak için Streptozotocin (STZ) (sigma S0130), anjiyotensin uygulaması için Ang (1-7) asetat tuzu (sigma A9202) kullanılmıştır. Elektrofizyolojik çalışmalarda kullanılacak kardiyak dokuların deney hayvanlarından çıkartılma işlemleri öncesinde anestezi altına alınmalarında sodyum penta-barbütal, basınç-hacim ölçümlerinde cerrahi işlem öncesi anestezi işleminde izofloran inhalasyon anesteziği kullanılmıştır. Kardiyak dokudan tek hücre kardiyomiyosit elde etmek için kollejenaz (Worthington kollejenaz tip 2) ve proteaz (sigma P5147) kullanılmıştır. Tüm elektrofizyolojik çalışmalar sırasında izolasyon solüsyonlarında, banyo ortamı için hazırlanan solüsyonlarında, ilgili akımların ölçümü için kullanılan pipet solüsyonlarında, western-blot ölçüm solüsyonlarında ve florometrik enzim aktivite ölçüm kitlerinde kullanılacak solüsyonlarda; NaCl (Sigma; S7653), HEPES (aplichem; A1069), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (AppliChem; A2943), Na<sub>2</sub>ATP (Sigma; A26209), Na<sub>2</sub>GTP (Sigma; G8877), KCl (Merck; K43406136), K-aspartat (Sigma; 11230), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma; P9791), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck; A952704), KOH (Sigma; P1767), glukoz (Fluka; 49159), MgSO<sub>4</sub> (Sigma; M7506), MgCl<sub>2</sub> (Sigma; M8266), MgATP (Sigma; A9187), CaCl<sub>2</sub> (Merck; K44296278), CdCl<sub>2</sub> (Fluka; 20899), EGTA (Applchem; A0878), DTA (Applchem; A5097), CsCl (Sigma; C4036), CsOH (Fluka; 21000), L-aspartik asit (Sigma; A9256), tetraetilamonyum (Sigma; T2265), fura penta-potasyum tuzu (Invitrogen (thermofisher); F1200), NaHCO<sub>3</sub> (Sigma; S6297), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma; 450243), NaOH (Merck; B0265262), TRİS-HCl (Sigma; T5941), TRİS-base (Sigma; T1503), DTT (Sigma; D9779), protez inhibitörü (Roche), NaF (Sigma; S7920), NP-40 tergitol (Sigma; NP40s), PMSF (Sigma; P7626), Na-deoksikolat (Sigma; D6750), akrilamid (Sigma; A8887), bisakrilamid (Sigma; 146072 ), amonyum persülfat (Sigma; A3678), TEMED (Sigma; T9281), bütanol (Merck; K28839388), glisin

(Sigma; G8898), SDS (Sigma; L3771), metanol (Merck; I557009), luminol (santa cruz; sc2048), lizis buffer (Sigma; 38733 ), Tween (Sigma; P9416), TritonX (Sigma T8787), TTBS (Sigma; T5912) ve BCA (Sigma; A2153) kullanılmıştır. Hücrelerin kafein cevabını oluşturmak için kafein (Sigma; C0750) kullanılmıştır. Western-blot ölçümlerinde antikör olarak RYR (Thermofisher; MA3-916), pRYR (Proteintech; 19765), SERCA (Santa cruz; sc-73022), PLB (Thermofisher; MA3-922), pPLB (Cell signaling; 8496), NCX (Santa cruz; sc-30304), Kv4.2 (Proteintech; 21298), LVCC (Proteintech; 21774), PKA (Cell signaling; D38C6), pPKA (Cell signaling; 4781), CaMKII (Santa cruz; sc-5306), pCaMKII (Santa cruz; sc-32289), PKC (proteintech; 21991), PLC (Proteintech; 66668), ACE (Proteintech; 24743), ACE2 (Proteintech; 21115), AT1R (Proteintech; 25343), MasR (Proteintech; 20080), ACE florometrik enzim aktivite ölçüm kiti (Biovision; K227), ACE2 florometrik enzim aktivite ölçüm kiti (Biovision; K897),  $\beta$ -Tübilin (Proteintech; 66240), GAPDH (Thermofisher; 15738), anti-mouse (Santa cruz; sc-2031), anti-rabbit (Santa cruz; sc-2004) ve BCA ölçüm kiti (Thermofisher; 23225) kullanılmıştır.

### **3.16 İstatistiksel Analiz**

Tüm deney sonuçları ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiştir. Tüm parametreler için normallik testi yapılmış ve bu dağılıma uyanlara parametrik One-Way ANOVA ve TUKEY post-hoc testi uygulanmıştır. Uymayan verilere nonparametrik Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U post-hoc testi uygulanmıştır. Çalışmamızdaki bütün istatistiksel değerlendirmelerin anlamlılığı  $p < 0,05$  olarak seçilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Deney Hayvanlarının Genel Durumu

Çalışmamızda oluşturduğumuz hipotezin test edilebilmesi için ilk adımımız uygulanan STZ sonucunda kan glukoz düzeylerini yükselterek deneysel diyabet koşullarını oluşturmaktır. Bu olgunun test edilmesi için deney hayvanlarının STZ uygulaması öncesinde ve sonrasında kan glukoz değerleri ölçüldü. Bununla birlikte uygulama ve bakım işlemlerinin sonunda deneysel işlemlere alınacak olan deney hayvanlarının makro anatomik verileri de (kalp ağırlığı, vücut ağırlığı, akciğer ağırlığı, tibia uzunluğu) değerlendirildi. Değerlendirmeye alınan verilerin tamamı Tablo 4.1.'de detaylı olarak verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Deney hayvanlarının elde edilen kan glukoz ve makro anatomik verileri. \* $p < 0,05$  vs K grubu.

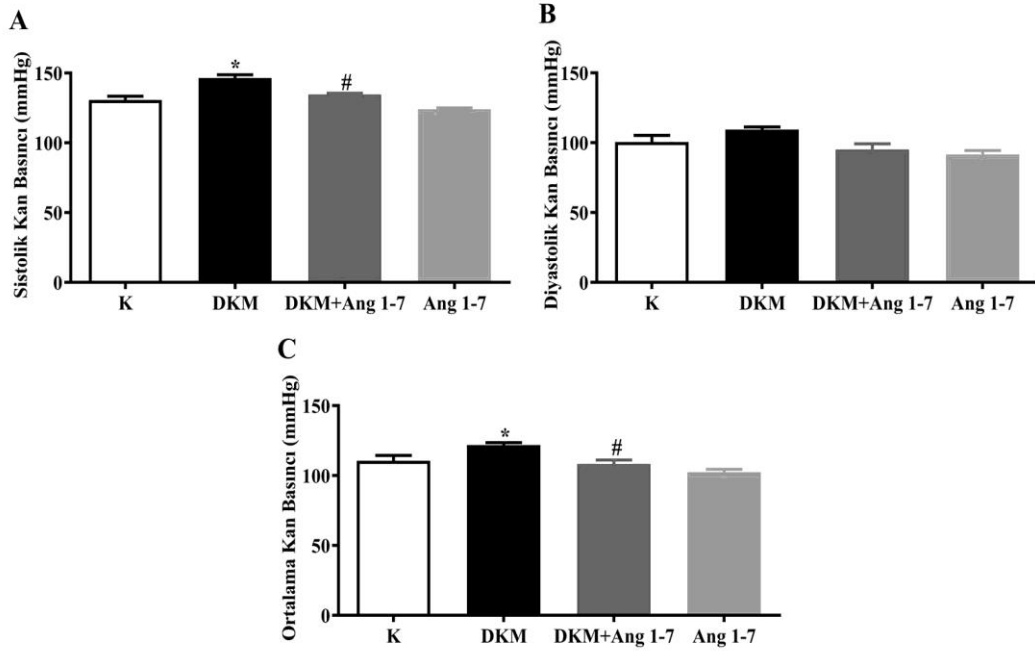
|                                                | <b>K</b><br>(n=24) | <b>DKM</b><br>(n=23) | <b>DKM+Ang 1-7</b><br>(n=19) | <b>Ang 1-7</b><br>(n=25) |
|------------------------------------------------|--------------------|----------------------|------------------------------|--------------------------|
| <b>Vücut Ağırlığı<sub>ilk</sub> (g)</b>        | 295,6 ± 7,07       | 309,7 ± 6,42         | 316,8 ± 11,54                | 307,8 ± 6,72             |
| <b>Vücut Ağırlığı<sub>son</sub> (g)</b>        | 328,4 ± 6,66       | 249,3 ± 8,76 *       | 271,7 ± 10,81 *              | 347,4 ± 6,72             |
| <b>Kan Glukoz Düzeyi<sub>ilk</sub> (mg/dL)</b> | 103,1 ± 3,41       | 113,5 ± 3,40         | 118,4 ± 4,26                 | 108,7 ± 4,85             |
| <b>Kan Glukoz Düzeyi<sub>son</sub> (mg/dL)</b> | 131,0 ± 5,17       | 524,1 ± 22,1 *       | 491,4 ± 31,8*                | 130,5 ± 6,3              |
| <b>Kalp Ağırlığı (g)</b>                       | 1,21 ± 0,03        | 1,09 ± 0,04*         | 1,07 ± 0,06*                 | 1,28 ± 0,05              |
| <b>Akciğer Ağırlığı (g)</b>                    | 1,67 ± 0,09        | 1,59 ± 0,03          | 1,52 ± 0,1                   | 1,90 ± 0,03              |
| <b>Tibia Uzunluğu (cm)</b>                     | 3,83 ± 0,03        | 3,76 ± 0,02          | 3,74 ± 0,07                  | 3,90 ± 0,02              |

STZ uygulaması sonucunda diyabetik koşulların oluşmasını planladığımız her iki deney grubundaki deney hayvanlarının kan glukoz düzeylerinde artış gözlenmiştir. DKM ve DKM+Ang 1-7 grupları son kan glukoz düzeyleri K grubu verilerine göre yaklaşık 4 kat artış göstermiştir (Tablo 1). DKM+Ang 1-7 grubunda kan glukoz düzeyi DKM grubuna kıyasla görece olarak bir azalış içerisinde olsa da, istatistiki olarak bir anlamlılığı yoktur. Dolayısıyla Ang (1-7) uygulamasının kan glukoz ya da diyabetik koşulların iyileştirilmesine dair bir etkisinin olmadığı söylenebilmektedir. Diyabetik koşulların morfometrik olarak değerlendirilmesi için ölçülen diğer parametreler ise vücut ağırlığı ve kalp ağırlığı olmuştur. STZ uygulaması sonrasında vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde DKM ve DKM+Ang1-7 gruplarında düşüş gözlenmiştir. Aynı tipte bir azalış kalp ağırlıkları için de geçerlidir. Bu iki veri incelendiğinde diyabetik koşulların kas kaybına neden olduğu ve Ang (1-7) uygulamasının bu durumda bir değişime neden olmadığı söylenebilmektedir. Akciğer ağırlıkları açısından deney grupları arasında her hangi bir farklılığa rastlanmaması deneysel diyabetik koşulların akciğer de ödem durumunu oluşturmadığı düşüncesine yönlendirmiştir.

## **4.2 Diyabetik Koşulların Sistemik ve Kalp Düzeyindeki Etkileri**

### **4.2.1 Diyabetin Kan Basıncı Üzerine Etkisi**

Diyabet multi organ yetmezliğine neden olan bir patolojidir. Bu nedenden dolayı sistemik bir etkiye sahiptir. Bu etkisini damar düz kasları üzerine de gösterebilmesinden dolayı kan basıncını da etkileyebilmektedir. Sistolik kan basıncı açısından DKM’de ( $146,4 \pm 6,6$  mmHg) K’ya ( $130,7 \pm 8,2$  mmHg) göre kan basıncında artış gözlenirken DKM+Ang 1-7’de ( $134,6 \pm 2,1$  mmHg) böyle bir artış gözlenmemiştir. Bunun yanında diyabetik koşullar dahilinde gerçekleşen bu artışı istatistiki olarak anlamlı bir azalışa yönlendirdiği bulgusuna ulaşılmıştır (Şekil 4.1.A). Diyastolik kan basıncı açısından deney grupları arasında istatistiki olarak anlamlı her hangi bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.1.B). Ortalama kan basıncı parametreleri incelendiğinde de sistolik kan basıncı için gözlemlediğimiz değişimin aynı şekilde gerçekleştiği bulgusuna ulaşılmıştır (K:  $110,6 \pm 11,7$  mmHg; DKM:  $121,8 \pm 5,2$  mmHg; DKM+Ang 1-7:  $108,3 \pm 6,4$  mmHg; Ang 1-7:  $102,4 \pm 7,6$  mmHg) (Şekil 4.1.C). Diyabetik koşullar altında artan kan basıncının azalmasını sağlayan Ang (1-7) uygulamasının, fizyolojik koşullar altında her hangi bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.1.** Deney hayvanlarının kuyruk kan basıncı ölçüm verileri. Diyabet sistolik ve ortalama kan basıncında artışa neden olmaktadır. Ang (1-7) uygulaması bu artışı engellemektedir. A) Sistolik kan basıncı ölçüm verileri, B) Diyastolik kan basıncı ölçüm verileri ve C) Ortalama kan basıncı ölçüm verileri. \* $p \leq 0,05$  vs K grubu, # $p < 0,05$  vs DKM grubu.

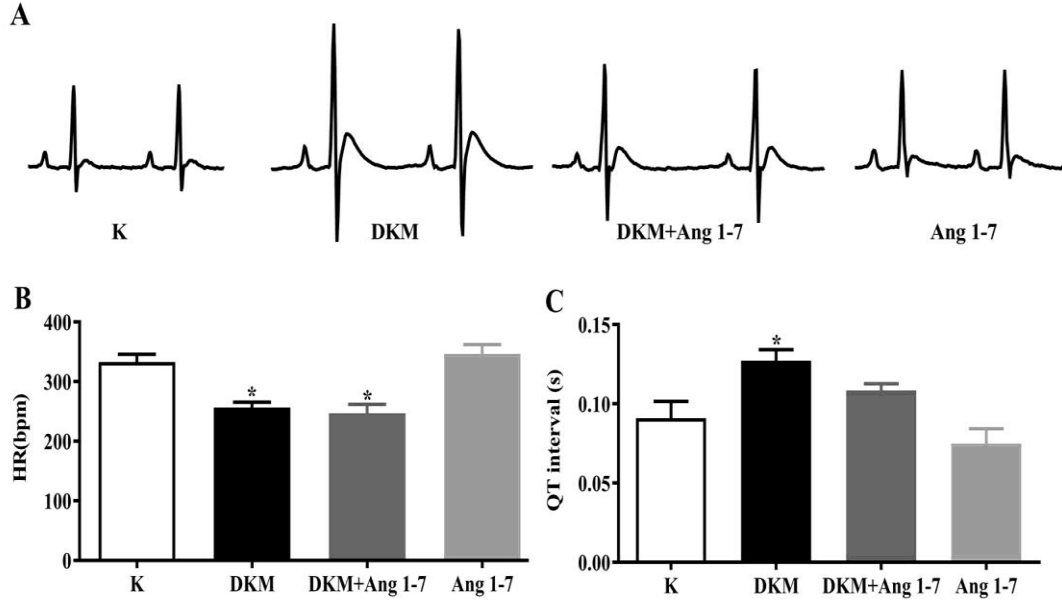
#### 4.2.2 Diyabetin Kardiyak Elektriksel Aktivite Üzerine Etkisi

Kardiyak patolojilerde, patolojinin nedeni ya da sonucu olsun kardiyak elektriksel aktivitedeki değişiklikler sık karşılaşılan bir durumdur. Kardiyomiyopati de bu patolojilerden bir tanesidir. Diyabetik koşulların ikincil olarak kardiyak dokuda miyopati oluşturduğu bilinmektedir. Bu durumun değerlendirilebilmesi için kullanılabilecek yöntemlerden bir tanesi de EKG'dir. Deneysel takvime uygun olarak bakım ve madde uygulaması biten deney hayvanları deneysel işlemlere alınmadan önce EKG ölçümleri yapılmıştır. Deney gruplarının EKG parametreleri Tablo 4.2.'de ve örnek kayıtlar Şekil 4.2.A'da sunulmuştur.

**Tablo 4.2.** Deney hayvanlarından ölçülen elektrokardiyografi parametreleri. \*p<0,005 vs K grubu.

|                                          | <b>K</b><br><b>(n=24)</b> | <b>DKM</b><br><b>(n=23)</b> | <b>DKM+Ang 1-7</b><br><b>(n=19)</b> | <b>Ang 1-7</b><br><b>(n=25)</b> |
|------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Kalp Hızı</b><br><b>(Atımsayı/dk)</b> | 332,7±34,58               | 256,5±25,60*                | 246,7±40,37*                        | 346,5±47,43                     |
| <b>P-R İntervali</b><br><b>(ms)</b>      | 53±8                      | 51±3                        | 54±7                                | 56±3                            |
| <b>P Süresi m(s)</b>                     | 17±2                      | 19±2                        | 18±2                                | 17±2                            |
| <b>QRS İntervali</b><br><b>(ms)</b>      | 22±3                      | 23±3                        | 22±5                                | 21±2                            |
| <b>Q-T İntervali</b><br><b>(ms)</b>      | 91±11                     | 123±9*                      | 112±7                               | 75±10                           |
| <b>QTc (ms)</b>                          | 160±45                    | 219±25*                     | 201±11                              | 148±45                          |
| <b>T Süresi (ms)</b>                     | 56±21                     | 101±29*                     | 91±0,020                            | 53±28                           |
| <b>P Genliği (V)</b>                     | 0,323±0,26                | 0,701±0,15*                 | 0,642±0,109*                        | 0,512±0,109                     |
| <b>QRS Genliği</b><br><b>(V)</b>         | 3,46±1,78                 | 6,73±1,58*                  | 5,96±1,07*                          | 4,42±1,04                       |

Diyabetik koşulların oluşturulduğu her iki deney grubunda da kalp hızı kontrol grubuna göre istatistiki olarak anlamlı bir şekilde azalmaktadır (Şekil 4.2.B). Atriyum depolarizasyon ile ilgili bilgi sunan P-R intervali ve P süresi açısından deney grupları arasında bir farklılık gözlenmezken, P dalgasının genliği diyabetik koşullar altında kontrole nazaran artış göstermektedir. Ventrikül depolarizasyonunun büyüklüğünü gösteren QRS genliğinde DKM ve DKM+Ang 1-7 gruplarında K'ya göre artış gözlenmektedir. Ventriküler repolarizasyon dalgasıyla ilgili süre bazlı en önemli bilgiyi sunan Q-T intervali açısından durum değerlendirildiğinde K'ya göre DKM'de uzama gözlenmektedir. Ancak bu uzama DKM+Ang 1-7 grubunda gözlenmemektedir. Dolayısıyla diyabet durumunda uzayan ventrikül repolarizasyon süresi, Ang (1-7) uygulaması ile engellenmiştir (Şekil 4.2.C).



**Şekil 4.2.** Deney hayvanlarından elde edilen EKG parametreleri. Diyabet kalp hızını azaltmaktadır. DKM ventrikül repolarizasyonu uzatmaktadır. A) Deney gruplarından elde edilen örnek EKG kayıtları. B) Deney gruplarının ortalama kalp atım hızı parametresi, C) Deney gruplarının QT verileri. \* $p < 0,05$  vs K grubu

#### 4.2.3. Diyabetik Kardiyomiyopatide Bozulan Sol Ventrikül Basınç-Hacim Dengesine Anjiyotensin (1-7) Uygulamasının Etkileri

Sol ventrikül basınç-hacim ilişkisi kalbin fonksiyonu ve sistemin hemodinamik dengesi hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlayan bir yöntemdir. Deney gruplarının hemodinamik parametreleri Tablo 4.3.'de ve örnek kayıtlarının gösterimi Şekil 4.3.A'da verilmiştir.

Kalbin organ bazında fonksiyonunu değerlendirmemizi sağlayan atım işi, kalp debisi ve atım hacmi parametrelerinde K'ya göre DKM'de azalış gözlenirken, DKM+Ang 1-7 grubunda bu azalışın engellendiği bulgusuna ulaşılmıştır. Fizyolojik koşullar altında Ang (1-7)'nin bir etkisi gözlenmemiştir (Şekil 4.3.B, C, D ve Tablo 4.3.). Sol ventrikül içerisindeki kanın aortaya ne kadarının gönderilebildiğine dair değerlendirmeyi ejeksiyon fraksiyonu (EF) parametresi ile değerlendirebilmekteyiz. DKM'de K'ya göre %EF azalırken, DKM+Ang 1-7'de bu azalış yavaşlatılmış ve K ile istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.4.A). Yukarıda bahsedilen bu dört parametrenin ışığı altında diyabetik kardiyomiyopati geliştikten sonra miyokardın fonksiyonunu kaybettiği, Ang (1-7) uygulaması sonucunda azalan fonksiyonun geri kazanılabildiği bulgusuna ulaşılmıştır. Bu bilgilere ilaveten diyastol sonu hacim DKM'de K'ya nazaran azalarak basınç-hacim

eğrisini daha sol tarafa yönlendirmektedir. Ang (1-7) uygulaması bu durumu engellemiş hatta K'nın da sağ tarafındaki bir konuma yerleştirmiştir (Tablo 4.3.).

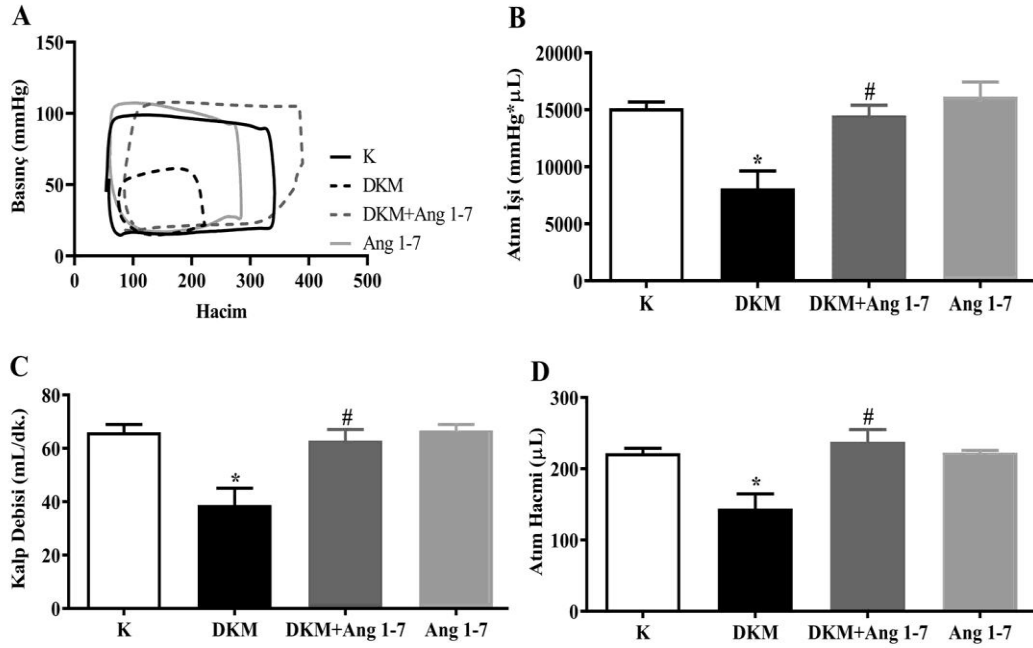
**Tablo 4.3.** Deney gruplarının hemodinamik verileri. \*p<0,05 vs K grubu, #p<0,05 DKM grubu

|                                      | <b>K</b><br><b>(n=10)</b> | <b>DKM</b><br><b>(n=10)</b> | <b>DKM+Ang 1-7</b><br><b>(n=10)</b> | <b>Ang 1-7</b><br><b>(n=10)</b> |
|--------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Atım İşi</b><br><b>(mmHg*µL)</b>  | 15130±551                 | 8110±1538*                  | 14510±899#                          | 16170±1271                      |
| <b>Kalp Debisi</b><br><b>(µL/dk)</b> | 66010±2953                | 38750±6350*                 | 62890±4183#                         | 66700±2235                      |
| <b>Atım Hacmi</b><br><b>(µL)</b>     | 221,9±6,89                | 144,2±20,75*                | 237,8±17,36#                        | 222,7±3,27                      |
| <b>Maksimum Hacim (µL)</b>           | 257,6±15,61               | 209,2±26,31                 | 317,7±25,49#                        | 274,0±5,86                      |
| <b>Minimum Hacim (µL)</b>            | 35,71±11,22               | 65,05±8,27                  | 79,97±11,33*                        | 51,28±4,65                      |
| <b>Sistol Sonu Hacmi (µL)</b>        | 41,37±12,13               | 70,27±8,16                  | 95,33±11,50*                        | 59,02±6,32                      |
| <b>Diyastol Sonu Hacmi (µL)</b>      | 252,0±14,74               | 179,5±21,84                 | 292,0±29,06#                        | 265,3±7,63                      |
| <b>Maksimum Basınç (mmHg)</b>        | 84,19±2,83                | 82,14±10,39                 | 91,61±4,51                          | 92,99±8,70                      |
| <b>Minimum Basınç (mmHg)</b>         | 6,45±2,17                 | 13,63±2,60                  | 13,77±1,25                          | 10,73±2,20                      |
| <b>Sistol Sonu Basıncı (mmHg)</b>    | 68,14±4,50                | 70,27±8,94                  | 83,7±4,37                           | 84,08±9,42                      |
| <b>Diyastol Sonu Basıncı (mmHg)</b>  | 13,35±2,13                | 18,76±4,02                  | 20,77±1,76                          | 15,24±3,50                      |

|                                       | <b>K</b><br><b>(n=10)</b> | <b>DKM</b><br><b>(n=10)</b> | <b>DKM+Ang 1-7</b><br><b>(n=10)</b> | <b>Ang 1-7</b><br><b>(n=10)</b> |
|---------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Ejeksiyon Fraksiyonu (%)</b>       | 88,41±3,16                | 69,58±4,63*                 | 79,53±2,49                          | 84,06±2,43                      |
| <b>Kardiyak Verim (Ratio)</b>         | 0,71±0,096                | 0,29±0,077*                 | 0,62±0,094                          | 0,59±0,031                      |
| <b>Arteryal Elastans (mmHg/μL)</b>    | 0,26±0,039                | 0,70±0,25*                  | 0,37±0,033                          | 0,38±0,04                       |
| <b>Sistol Sonu Elastans (mmHg/μL)</b> | 2,64±0,64                 | 0,98±0,17                   | 1,11±0,13                           | 1,59±0,33                       |
| <b>Basınç-Hacim Alanı (mmHg*μL)</b>   | 20800±1703                | 10280±3071*                 | 26190±3674#                         | 25540±5117                      |
| <b>Potansiyel Enerji (mmHg*μL)</b>    | 9240±1962                 | 5054± 973*                  | 18940±2891*#                        | 9362±2137                       |
| <b>Tau (ms)</b>                       | 13,70±1,35                | 30,62±2,98*                 | 22,76±0,74#                         | 15,86±1,43                      |
| <b>dP/dt (mmHg/s)</b>                 | 486 ±352                  | 2789±427*                   | 4664±594#                           | 4704±413                        |

Dolayısıyla kardiyak verimlilik diyabet koşullarında kontrole kıyasla kayba uğrarken, Ang (1-7) uygulaması bu kaybı engellemeyi başarmıştır (Şekil 4.4.B ve Tablo 4.3.). DKM+Ang 1-7 grubunda sağlanan bu düzelmelerin kasılabilirliğe katkı sağlayacak olan potansiyel enerjinin (PE) artışına da katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. DKM'nin PE'sinde K'ya göre azalış gözlemlenmiş ve Ang (1-7) uygulaması bu durumu toparlamıştır. Özellikle atım işi, atım hacmi ve %EF değerlendirildiğinde PE azalışının da patofizyolojik duruma katkı sağladığı göz önünde tutulması gereken bir veri olarak karşımıza çıkmaktadır. PVA, atım işi ve PE'nin birlikte değerlendirildiği bir kavramdır. Kısaca toplam enerjiyi ya da verimli bir şekilde basınç-hacim ilişkisinin dengesini koruyabileceği maksimum sınırları

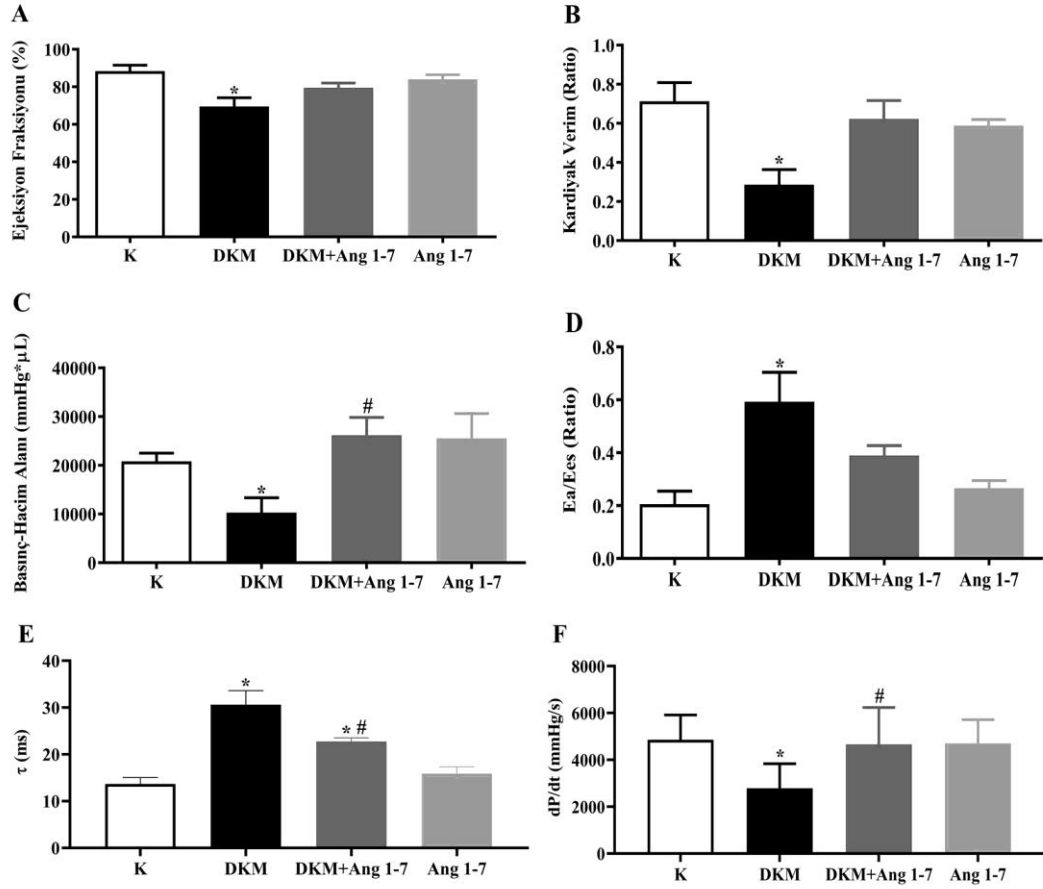
göstermektedir. K'ya göre DKM'de gözlenen düşüş, DKM+Ang 1-7'de engellenerek kontrol seviyelerine geri gelmiştir (Şekil 4.4.C ve Tablo 4.3.).



**Şekil 4.3.** Deney gruplarından elde edilen hemodinamik parametrelerin gösterimi. DKM %EF, SW, CO ve SV seviyelerinde azalışa neden olmaktadır. Ang (1-7) uygulaması bu değişimleri engellemiştir. A) Deney gruplarının ortalama %EF değerleri, B) Deney gruplarının ortalama kalp işi değerleri, C) Deney gruplarının ortalama kalp debisi değerleri ve D) Deney gruplarının ortalama atım hacmi değerleri. \* $p < 0,05$  vs K grubu, # $p < 0,05$  vs DKM grubu.

Hemodinamik açıdan sol ventrikül ve aorta etkileşim halindedir. Çünkü hem hacim hem de basınç birliktelikleri vardır. Ea/Ees bu birlikteliğin seviyesi hakkında bilgi vermektedir. Bu oranın artması arteriyel elastansın arttığını, dolayısıyla ventrikül kasılabilirliğinin bozulmasının yanında periferel vasküler direncin de arttığını göstermektedir. Bu bağlamda deney grupları değerlendirildiğinde K'ya göre DKM'de artış gözlenmektedir. Bununla birlikte Ang (1-7) uygulamasının diyabetik patofizyolojik koşullar altında bu artışı engelleyebildiği bulgusuna da ulaşılmıştır (Şekil 4.4.D ve Tablo 4.3.). Diyastolik fonksiyon bozukluğunu açıklamada kullanılan ve aktif relaksasyon süresini belirten parametre  $\tau$  değeridir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre DKM'de aktif relaksasyon süresinde uzama bulgusuna ulaşılmıştır. DKM+Ang (1-7) grubunda ise relaksasyon süresi kısalmıştır (Şekil 4.4.E ve Tablo 4.3.). Sol ventrikülün dolum hızının değerlendirildiği  $dp/dt$  parametresinde, DKM'de hızın düşüdüğü ancak Ang (1-7) uygulaması ile bu düşüşün engellendiği bulgusuna ulaşılmıştır (Şekil 4.4.F ve Tablo 4.3.).

Bununla birlikte fizyolojik koşullar altında Ang (1-7) uygulamasının hemodinamik parametreler üzerine etkisinin olmadığı da gösterilmiştir.



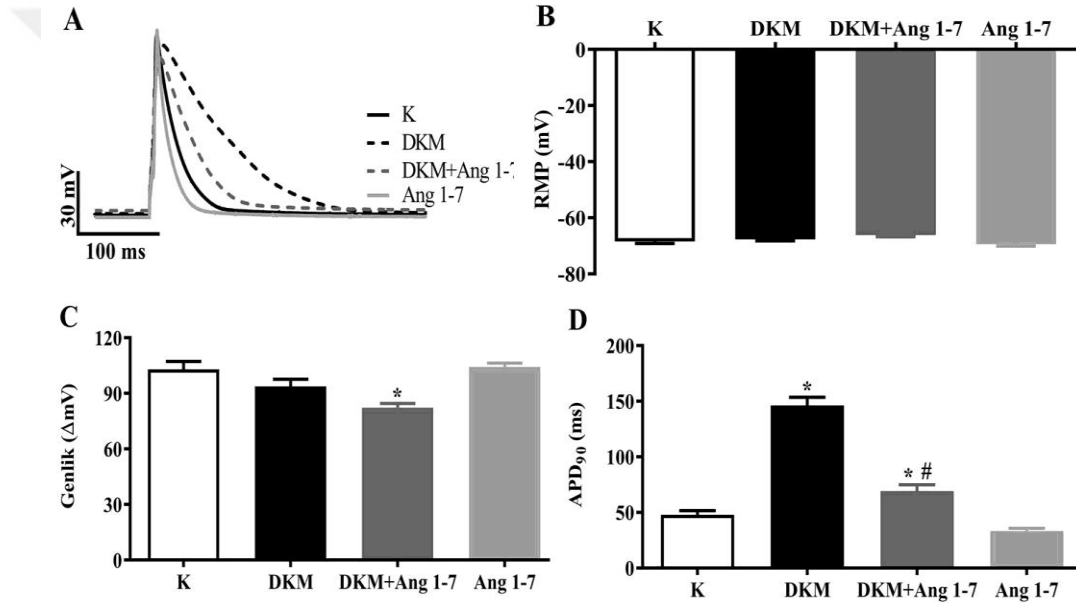
**Şekil 4.4.** Deney gruplarının sol ventrikül hemodinamik verileri. DKM kardiyak verimlilikte azalışa neden olmuştur. Bununla birlikte arteriyel elastansda da artış gözlenmiştir. A) deney gruplarının ortalama kardiyak verimlilik değerleri, B) Deney gruplarının ortalama basınç-hacim alanı verileri ve C) Deney gruplarının Ea/Ees ortalama verileri. D) Deney gruplarının ortalama  $\tau$  verileri. E) Deney gruplarının ortalama dP/dt verileri. \*p<0,05 vs K grubu, #p<0,05 DKM grubu.

### 4.3. Diyabetik Kardiyomiopatinin Hücre Düzeyinde Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi Üzerine Etkileri

#### 4.3.1. Diyabetik Kardiyomiopatinin ve Anjiyotensin (1-7) Uygulamasının Kardiyomiyosit Aksiyon Potansiyeli Üzerine Etkileri

Uyarılma-kasılma çiftlenimi kardiyomiyositlerin fonksiyonunu anlatan temel olgudur. Bu olgu iki kısımdan oluşur. Bunlardan ilki uyarılma kısmını açıklayan kardiyak AP'dir. Yapılan ölçümler sonucunda dinlenme zar potansiyeli açısından deney grupları arasında bir fark gözlemlenmemiştir (K:  $-68,43 \pm 3,03$  mV; DKM:  $-67,69 \pm 2,38$  mV; DKM+Ang 1-7:  $-66,17 \pm 2,38$  mV) (Şekil 4.5.B). AP'nin genlik parametresinde DKM ( $103,0 \pm 18,39$  mV) ve K ( $93,76 \pm 17,40$  mV) arasında bir

farklılık gözlenmemişken, DKM+Ang 1-7 ( $82,23 \pm 9,48$  mV) grubunda K'ya nazaran istatistiki olarak anlamlı bir azalış bulgusuna ulaşılmıştır (Şekil 4.5.C). Uyarılmaya AP'nin sunduğu temel katkı AP'nin repolarizasyon süresidir ( $APD_{90}$ ). Bu sürenin uzaması uyarılma olgusunda bozulmalara neden olmaktadır. Bu parametre incelendiğinde DKM ( $146,3 \pm 32,93$  ms) grubunda  $APD_{90}$ 'nın K'ya ( $47,89 \pm 15,83$  ms) göre uzadığı sonucuna ulaşılmıştır. Ang (1-7) ( $69,33 \pm 22,81$  ms) uygulamasının diyabetik koşullardan dolayı uzayan bu sürenin kontrol seviyelerine çekilmesine neden olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.5.D). Ayrıca fizyolojik koşullar altında Ang (1-7) uygulamasının kardiyomiyosit AP parametreleri üzerine bir etkisi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

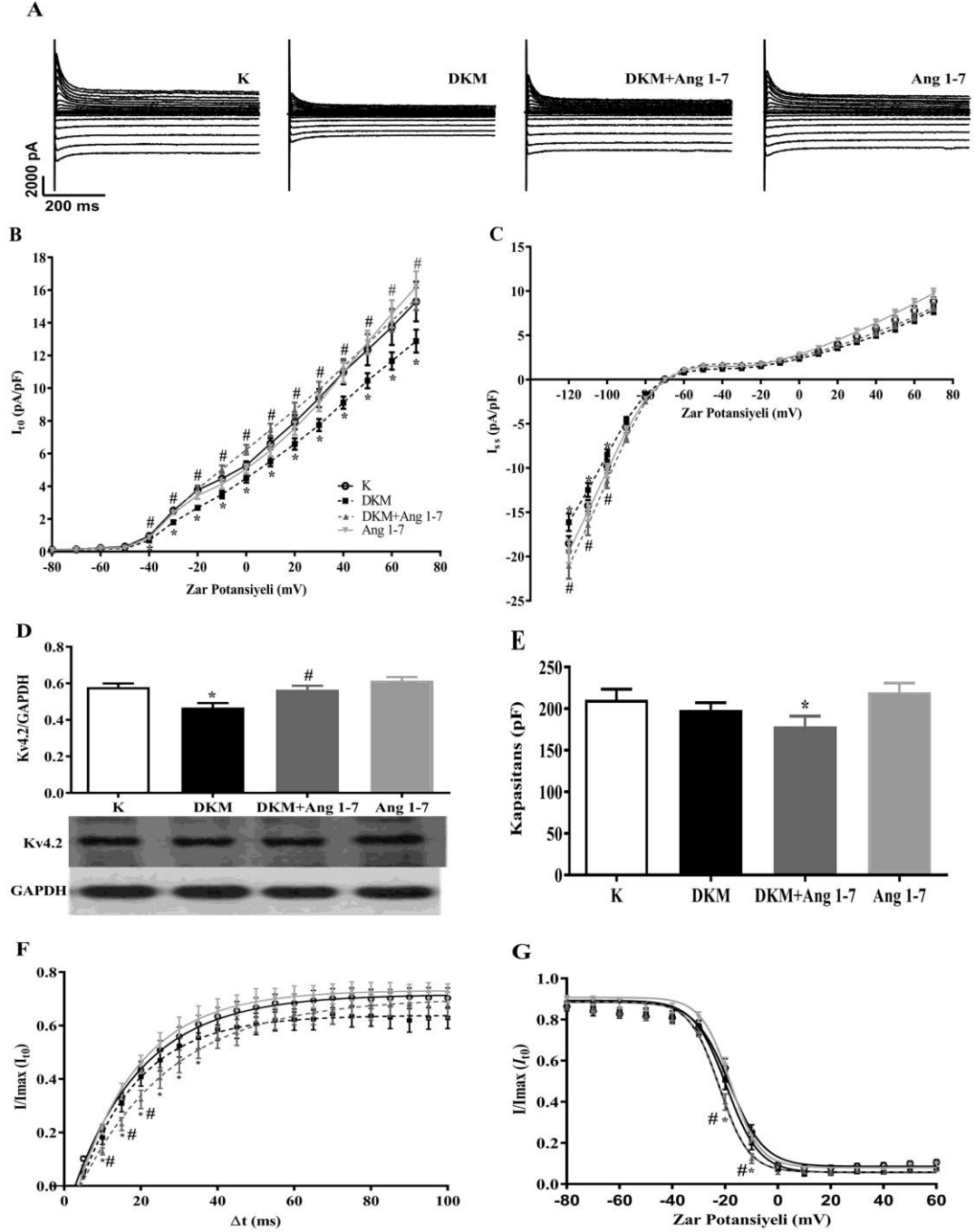


**Şekil 4.5.** DKM AP repolarizasyon süresini uzatmaktadır. Ang (1-7) uygulaması bu azalışı engellemektedir. Bunun yanında DKM+Ang 1-7'de AP genliğinde azalma gözlenmektedir. Deney gruplarından ölçülen AP parametre değerleri. A) Deney gruplarının ortalama AP'lerinin şematik olarak gösterimi, B) Deney gruplarının ortalama dinlenim zar potansiyeli verileri, C) Deney gruplarının ortalama AP genlik verileri ve D) Deney gruplarının ortalama repolarizasyon ( $APD_{90}$ ) verileri. \* $p < 0,05$  vs K grubu, # $p < 0,05$  vs DKM grubu.

#### 4.3.2. Diyabetik Kardiyomiyopatinin ve Anjiyotensin (1-7) Uygulamasının Voltaja Bağımlı Potasyum Kanal Akımları Üzerine Etkileri

Literatür diyabetik kardiyomiyopati patofizyolojinde gözlemlenen  $APD_{90}$  süresindeki uzamanın temel nedeninin  $K^+$  akımlarının olduğunu söylemektedir. Aldığımız ölçümler sonucunda literatürle benzer bulgulara ulaşılmış ve DKM'de K'ya göre  $I_{to}$  (pA/pF)'da istatistiki olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bilgisine ulaşılmıştır. Ang (1-7) uygulaması sonrasında ise bu azalma engellenmiş ve kontrol seviyelerine geri

dönmüştür (Şekil 4.6.B).  $I_{ss}$  (pA/pF)'da deney grupları arasında bir farklılık gözlemlenmemişken,  $I_{ss}$ 'in -120 mV ile -50 mV arasında etkin olduğu bilinen ve hem AP'nin repolarizasyon süresinin belirlenmesine katkı sağlayan hem de dinlenim zar potansiyelinin belirlenmesinde başat rol oynayan  $I_{K1}$  (pA/pF)'da, K grubuna kıyasla DKM grubunda azalış verilerine ulaşılmıştır (Şekil 4.6.C). Kanal akımlarında gerçekleşen bu değişimlerin nedenini moleküler seviyede açıklayabilmek için voltaja bağımlı potasyum kanalı olan Kv4.2'nin protein seviyeleri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda akım verilerine paralel ve tutarlı olarak K'ya nazaran ilgili protein seviyesinde azalma bulgusuna ulaşılırken, DKM+Ang 1-7'de ise protein ekspresyon düzeyinin kontrol seviyelerine döndüğü belirlenmiştir (Şekil 4.6.D). Voltaja bağımlı potasyum kanal kinetikleri değerlendirildiğinde, kanalın kapanma potansiyeli yani deaktivasyon kinetiğinde deney grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 4.6.G ve Tablo 4.4). Diğer yandan kanalın yeniden ne kadar süre içerisinde aktif olacağını belirleyen reaktivasyon kinetiği açısından erken safhada DKM+Ang 1-7 grubunda K'ya göre bir azalış mevcut olsa da, ilerleyen süreçte bu fark ortadan kalkmıştır (Şekil 4.6.F ve Tablo 4.4.). Fizyolojik koşullar altında Ang (1-7) uygulamasının voltaja bağımlı kanal akımları, kanal kinetikleri ve Kv4.2 protein ekspresyonu açısından her hangi bir değişime neden olmadığı tespit edilmiştir.



**Şekil 4.6.** DKM  $I_{0}$  ve  $I_{K1}$  akımlarında azalışa neden olmaktadır. Ang (1-7) uygulaması bu azalışı engellemiştir. Bununla birlikte Kv4.2 kanal protein seviyesi DKM’de azalmış, DKM+Ang 1-7’de artmıştır. Voltaj kenetleme yöntemi kullanılarak deney gruplarından elde edilen voltaja bağımlı potasyum kanal akımı ve western-blot yöntemi ile ölçülen voltaja bağımlı potasyum kanal proteini ekspresyon verileri. A) Deney gruplarından elde edilen voltaja bağımlı potasyum kanal akımlarının ortalama kayıt verileri, B) Deney gruplarından elde edilen  $I_0$  (pA/pF) verileri, C) Deney gruplarında elde edilen  $I_{ss}$  (pA/pF) verileri, D) Deney gruplarının Kv4.2 protein ekspresyon verileri, E) Deney gruplarının ortalama hücre kapasitans verileri, F) Deney gruplarından elde edilen voltaja bağımlı potasyum kanalı reaktivasyon kinetiği verileri ve G) Deney gruplarından elde edilen voltaja bağımlı potasyum kanalı deaktivasyon kinetiği verileri. \* $p < 0,05$  vs K grubu, # $p < 0,05$  vs DKM grubu.

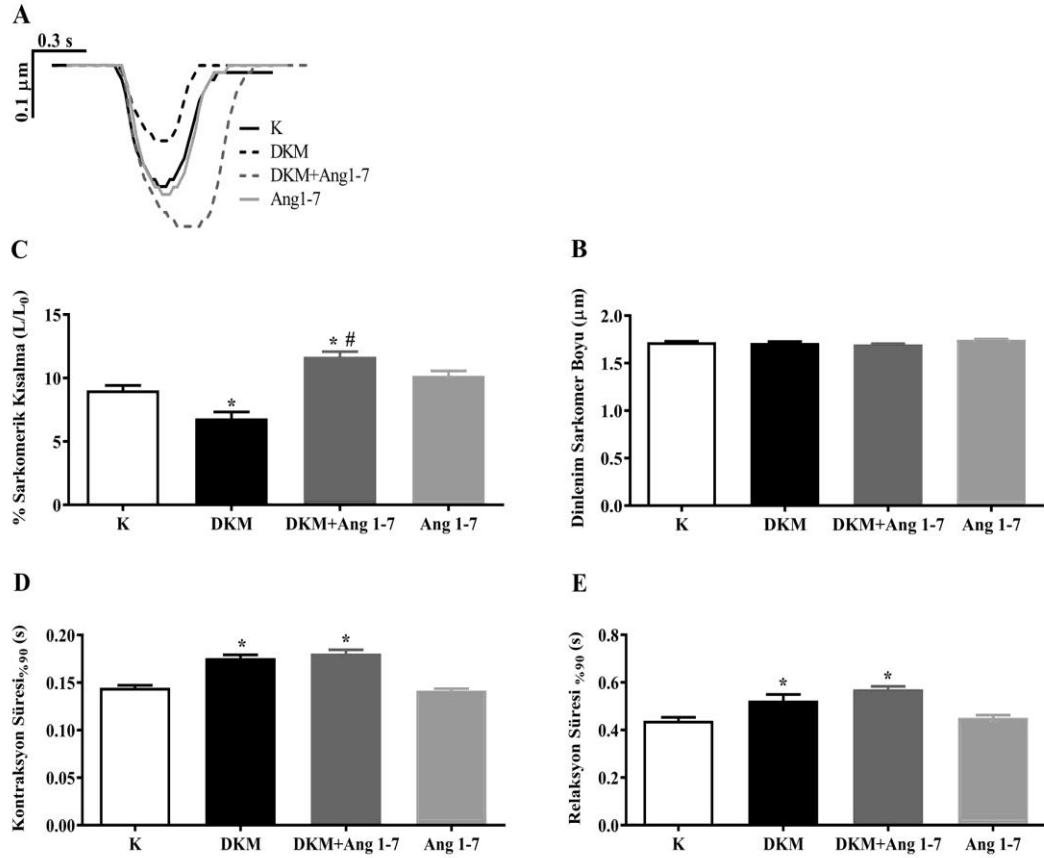
**Tablo 4.4.** Deney gruplarından elde edilen voltaja bağımlı potasyum kanal kinetiklerinin verileri.

|                     | K             | DKM           | DKM+Ang 1-7   | Ang 1-7       |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Reaktivasyon</b> |               |               |               |               |
| <b>Y0</b>           | -0,1213±0,050 | -0,1941±0,066 | -0,1383±0,053 | -0,1926±0,058 |
| <b>Plato</b>        | 0,7165±0,013  | 0,6386±0,014  | 0,7038±0,022  | 0,7318±0,013  |
| <b>K</b>            | 0,0551±0,005  | 0,0641±0,008  | 0,0418±0,022  | 0,0615±0,006  |
| <b>Deaktivasyon</b> |               |               |               |               |
| <b>Bottom</b>       | 0,0865±0,009  | 0,0566±0,007  | 0,0588±0,007  | 0,0804±0,007  |
| <b>Top</b>          | 0,885±0,008   | 0,8931±0,006  | 0,8868±0,007  | 0,9075±0,06   |
| <b>LogEC50</b>      | -18,34±0,64   | -19,47±0,45   | -22,21±0,49   | -18,08±0,45   |
| <b>Hillslope</b>    | -0,0663±0,006 | -0,0697±0,004 | -0,0773±0,006 | -0,0781±0,006 |

#### 4.3.3. Diyabetik Kardiyomiyopatinin ve Anjiyotensin (1-7) Uygulamasının Kontraktil Parametreler Üzerine Etkileri

Kardiyomiyositlerin fonksiyonunu değerlendirmemizi sağlayan uyarılma-kasılma çiftleniminin diğer ayağı kasılma tarafıdır. Deney grupları arasında dinlenme sarkomer boyu bakımından her hangi bir farklılık gözlemlenmemiştir (K:  $1,72 \pm 0,05 \mu\text{m}$ ; DKM:  $1,71 \pm 0,08 \mu\text{m}$ ; DKM+Ang 1-7:  $1,70 \pm 0,04 \mu\text{m}$ ) (Şekil 4.7.B). Ancak % kılma boyu için durum değişmiştir. Diyabet kardiyomiyosit kılmasını etkilemiş ve kontrole göre % kılma boyunda düşüş gözlemlenmiştir. Ang (1-7) uygulaması diyabetin kardiyomiyositler üzerinde oluşturduğu bu etkiyi ortadan kaldırmış ve % kılma boyu değerlerini kontrol seviyelerine geri çekmiştir (K:  $9,03 \pm 1,97$ ; DKM:  $6,82 \pm 2,45$ ; DKM+Ang 1-7:  $11,68 \pm 2,04$ ) (Şekil 4.7.C). Bununla birlikte kasılmanın kinetik fonksiyonlarını incelediğimizde Ang (1-7)'nin olumlu etkileri gözlemlenmemiştir. Diyabetik koşullar sonucunda her iki grupta da hem kılma süresi hem de gevşeme süresinde kontrole göre uzamalar kaydedilmiştir (Kılma

[K:  $0,145 \pm 0,014$  s; DKM:  $0,176 \pm 0,017$  s; DKM+Ang 1-7:  $0,181 \pm 0,019$  s], Gevşeme [K:  $0,44 \pm 0,07$  s; DKM:  $0,52 \pm 0,12$  s; DKM+Ang 1-7:  $0,57 \pm 0,06$  s]) (Şekil 4.7.D ve E). Fizyolojik koşullar altında Ang (1-7) uygulamasının kontraktıl parametrelerin hiçbirinde değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir.

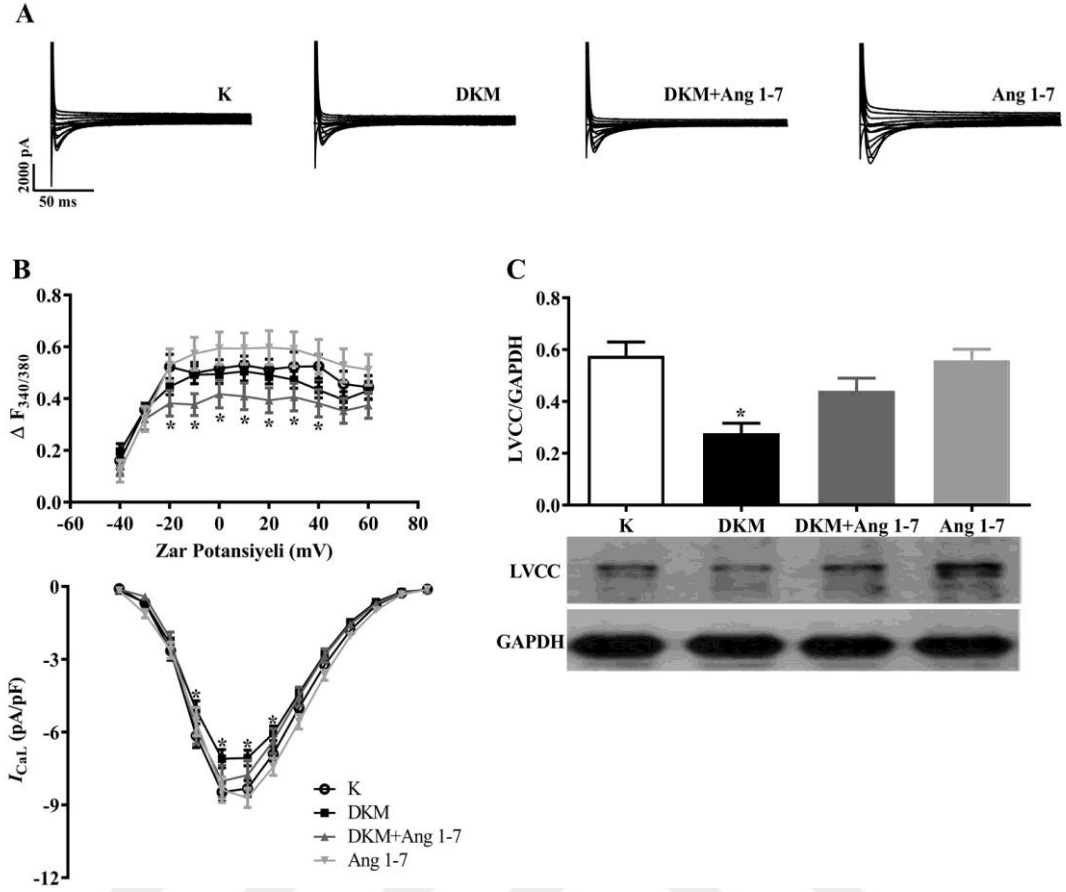


**Şekil 4.7.** DKM kısalma boyunda azalmaya ve kısalma kinetiklerinde yavaşlamaya neden olmaktadır. DKM+Ang 1-7’de kısalma boyu kontrol seviyesinde üzerine çıkacak düzeyde artmış ancak kısalma kinetiklerinde yavaşlama değişmemiştir. Kardiyomiyositlere elektriksel alan uyarımı ile elde edilen kontraktıl parametre verileri. A) Deney gruplarının ortalama kasılma örneklemeleri, B) Deney gruplarının ortalama dinlenimsarkomer boyu verileri, C) Deney gruplarının ortalama % kısalma boyu verileri, D) Deney gruplarının ortalama kontraksiyon süresi verileri ve E) Deney gruplarının ortalama relaksasyon süresi verileri. \* $p < 0,05$  vs K grubu, # $p < 0,05$  vs DKM grubu.

#### 4.3.4. Diyabetik Kardiyomiyopati ve Anjiyotensin (1-7) Uygulamasının Voltaja Bağımlı Kalsiyum Akımları ve Eş Zamanlı Kalsiyum Transientleri Üzerine Etkileri

$Ca^{2+}$  kardiyomiyositler için uyarılma sonucunda zardan geçebilen ve hücre içi bazı fonksiyonların (CICR, gibi) başlamasını sağlayan bir tetikleyici olarak görev yapmanın dışında, hücre içinde ikincil sinyal molekülü olarak da görev yapmaktadır (hücre içi kinazların aktivasyonu, sarkomerik kısalma gibi). Dolayısıyla kardiyomiyosit fonksiyonunda önemli bir yer almaktadır. Hücre içi ana kaynağı SR

olmasına rağmen, bu organelden  $Ca^{2+}$  temin edebilmek için hücre zarının elektriksel olarak uyarımı ve voltaja bağımlı  $Ca^{2+}$  kanallarından hücre içerisine  $Ca^{2+}$  geçişinin olması gerekmektedir. Voltaj kenetleme tekniği kullanılarak yapılan ölçümler sonucunda DKM grubunda  $I_{CaL}$  yoğunluğunda K'ya göre azalış gözlemlenmiştir. DKM+Ang 1-7 grubunda DKM'ye göre artış diğer yandan K'ya göre azalış gözlenmesine rağmen bu fark ne K'ya ne de DKM'ye göre istatistiki olarak anlamlı değildir. Dolayısıyla diyabetik koşullar altında azalan  $I_{CaL}$  yoğunluğu Ang (1-7) uygulanmasıyla tam olarak engellenmese de, yönelimin yavaşlatılabildiği söylenebilmektedir. İlgili potansiyel seviyelerinde giren  $Ca^{2+}$ 'a karşı SR'dan dökülen  $Ca^{2+}$ 'un ölçülmesiyle, CICR kapsamında bu etkileşimi anlayabilmekteyiz. Yapılan ölçümler ile DKM+Ang 1-7 grubunda SR'dan salınan  $Ca^{2+}$  miktarında azalma olduğu bulgusuna ulaşılmıştır. Diğer deney gruplarında ise K'ya kıyasla bir farklılık yoktur (Şekil 4.8.B).  $I_{CaL}$  yoğunluğundaki değişimlerin nedenini açıklayabilmek için western-blot yöntemiyle kanal protein ekspresyonu incelenmiştir. İnceleme sonucunda DKM grubunda protein ekspresyon miktarının K'ya nazaran azaldığı, DKM+Ang 1-7 grubunda ise bu azalışın istatistiki olarak anlamlı olmadığı bulgusuna ulaşılmıştır (Şekil 4.8.C).

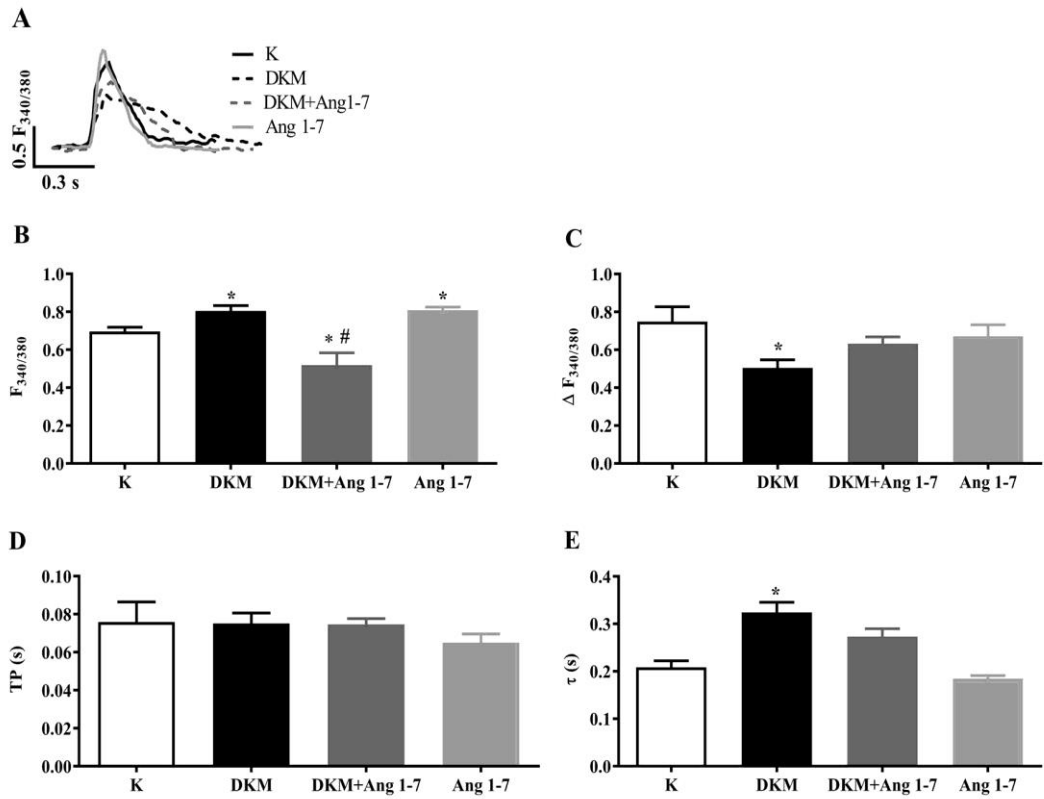


**Şekil 4.8.** DKM L-tipi  $Ca^{2+}$  akım yoğunluğunda ve LVCC protein miktarında azalmaya neden olmuştur. DKM+Ang 1-7'de ise bu doğrultuda azalışlar olsa da, daha düşük seviyede gerçekleşmiş ve istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. DKM+Ang 1-7'de giren  $Ca^{2+}$  karşı SR'dan dökülen  $Ca^{2+}$  miktarında azalma gözlenmiştir. Voltaja bağımlı kalsiyum kanalı ve eş zamanlı olarak kaydedilen hücre içi kalsiyum transientlerinin gösterimi. A) Voltaja bağımlı kalsiyum kanal akımlarının, deney gruplarını ait örnek kayıtları, B) Deney gruplarından elde edilen voltaja bağımlı kalsiyum kanal akımı ve eş zamanlı kalsiyum transient verileri ve C) Deney gruplarının voltaja bağımlı kalsiyum kanalı protein ekspresyonunun ortalama değerleri. \* $p < 0,05$  vs K grubu, # $p < 0,05$  vs DKM grubu.

#### 4.3.5. Diyabetik Kardiyomiyopati ve Anjiyotensin (1-7) Uygulamasının Bazal ve Hücre İçi Geçici Kalsiyum Transientleri Üzerine Etkileri

Bu parametre uyarım sonucunda giriş yapan  $Ca^{2+}$  sayesinde SR'dan salınan  $Ca^{2+}$  un diyastolik ve sistolik döngüler arasındaki bazal seviyeleri ve değişimin kinetik bilgilerini bizlere sunmaktadır. Elektriksel alan uyarı yardımıyla 1 Hz frekansta kaydedilen kayıtlar incelendiğinde, DKM'de bazal seviyenin K'ya nazaran arttığı ( $0,81 \pm 0,1$ ) DKM+Ang 1-7 deney grubunda ise ( $0,52 \pm 0,25$ ) bazal seviyenin azaldığı gözlenmiştir (K :  $0,77 \pm 0,10$ ) (Şekil 4.9.B). Bu bağlamda DKM grubunun diyastolik  $Ca^{2+}$  seviyesinin arttığı, DKM+Ang 1-7 grubunda ise diyastolik  $Ca^{2+}$  seviyesinin düştüğünü söyleyebiliriz. Sistol sırasında dökülen  $Ca^{2+}$  miktarı DKM'de azalmış, DKM+Ang 1-7'de K'ya göre değişim olmamıştır (K:  $0,75 \pm 0,27$ ; DKM:

0,51 ± 0,18; DKM+Ang 1-7: 0,63 ± 0,14) (Şekil 4.9.C). Bununla birlikte dökülme hızı açısından deney grupları arasında bir farklılık gözlenmemiş (K: 0,076 ± 0,036 s; DKM: 0,075 ± 0,023 s; DKM+Ang 1-7: 0,075 ± 0,012 s) (Şekil 4.9.D),  $Ca^{2+}$ 'un SR içerisine geri alınım hızının DKM grubunda (0,32 ± 0,09 s) yavaşladığı bulgusuna erişilmiştir (Şekil 4.10.E). DKM+Ang 1-7 (0,27 ± 0,06 s) deney grubunda da K'ya (0,21 ± 0,05 s) kıyasla bir yavaşlama fark edilmektedir, ancak bu durum istatistiki olarak bir anlam ifade etmemektedir. Fizyolojik koşullar altında uygulanan Ang (1-7)'nin bazal  $Ca^{2+}$  düzeyi hariç her hangi bir etkiye sahip olmadığı da elde edilen sonuçlar doğrultusunda ortaya konulmuştur.

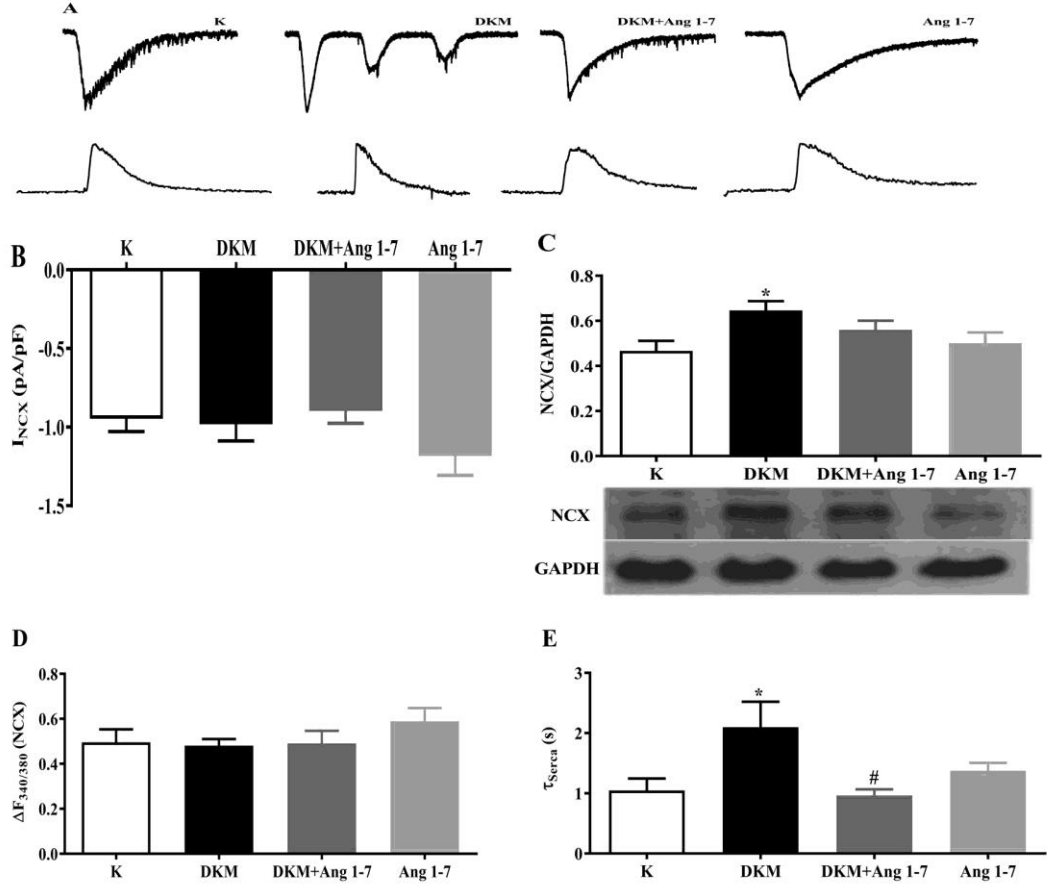


**Şekil 4.9.** DKM diyastol durumundaki bazal  $Ca^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  geri alım süresinin uzamasını, sistol sırasında dökülen  $Ca^{2+}$  miktarını azaltmasını sağlamaktadır. Sitozolden  $Ca^{2+}$  geri alım süresini uzatmıştır. DKM+Ang 1-7'de ise bu tip değişimler gözlenmemiştir. Ayrıca DKM+Ang 1-7'de bazal  $Ca^{2+}$  seviyesi azalmıştır. Elektriksel alan uyarımı yöntemiyle elde edilen hücre içi bazal ve geçici kalsiyum transiyent değişimleri. A) Deney gruplarının örnek kayıtları, B) Deney gruplarından elde edilen ortalama bazal kalsiyum seviyeleri, C) Deney gruplarından elde edilen ortalama dökülen kalsiyum seviyeleri, D) Deney gruplarında elde edilen ortalama kalsiyumun dökülme süresi ve E) Deney gruplarında elde edilen kalsiyumun SR içerisine geri alım süresi. \* $p<0,05$  vs K grubu, # $p<0,05$  vs DKM grubu.

#### 4.3.6. Diyabetik Kardiyomiyopatinin ve Anjiyotensin (1-7) Uygulamasının Sodyum-Kalsiyum Değiştokuşçusu Akımı ve Kafein İndüklü Kalsiyum Transientleri Üzerine Etkileri

Hücre içi serbest  $Ca^{2+}$ 'un belirlenmesi diyastol sırasında sitoplazmadan uzaklaştırılabilen  $Ca^{2+}$  seviyesine bağlıdır. Bu olgunun temel bileşeni SR içerisine alınan  $Ca^{2+}$  seviyesidir. SR'dan sonra ikincil önemli olan durum ise NCX sayesinde hücre dışarısına atılan  $Ca^{2+}$  seviyesidir. Yapılan ölçümler neticesinde  $I_{NCX}$  (pA/pF) bakımından deney grupları arasında bir farklılığa rastlanmamıştır (Şekil 4.10.B). Bunun yanında NCX protein seviyesi incelenmiş ve DKM grubunda K'ya göre bir artış tespit edilirken diğer gruplarda bir farklılık gözlenmemiştir (K:  $0,47 \pm 0,11$ ; DKM:  $0,65 \pm 0,10$ ; DKM+Ang 1-7:  $0,56 \pm 0,10$ ) (Şekil 4.10.C). Kafein indüklü  $I_{NCX}$  ve buna bağlı değişen transient ölçümü, SR içeriğini değerlendirmemize de yardımcı olmaktadır.  $I_{NCX}$ 'in alanı ve kafein indüklü oluşan transientin genliği SR içeriğini değerlendirdiğimiz parametrelerdir. Transient genlikleri değerlendirildiğinde DKM'de azalış yönünde bir eğilim olsa da, istatistiki anlamlılığı bulunmamaktadır. Diğer deney gruplarında da K'ya göre bir anlamlı değişim gözlenmemiştir (K:  $0,50 \pm 0,05$ ; DKM:  $0,48 \pm 0,03$ ; DKM+Ang 1-7:  $0,49 \pm 0,06$ ) (Şekil 4.10.D). Ancak  $I_{NCX}$ 'ten geçen yük miktarı ya da alan (pA\*ms/pF) parametresi incelediğinde DKM ( $0,0053 \pm 0,0036$ ) grubunda artış bulgusuna ulaşılmıştır (K:  $0,0017 \pm 0,0014$ ; DKM+Ang 1-7:  $0,0038 \pm 0,0032$ ). Bu durum  $I_{NCX}$ 'in  $\tau$  değerindeki artışa bağlı olarak gerçekleşmektedir (K:  $411,1 \pm 155$  ms; DKM:  $825 \pm 590$  ms; DKM+Ang 1-7:  $620 \pm 251$  ms). Çünkü alan parametresi hesaplanırken akım yoğunluğu ve zaman sabiti birlikte değerlendirilmektedir. DKM grubunda bu tip bir değişimi gözlemlememizin nedeni olarak örneklem sayımızın %50'sinde gözlediğimiz kafein uyarısına karşın tek seferde RYR'nin boşalmasının sağlanamadığı ve iki ya da üç salınımlı bir dökülme göstermesine bağlı olarak zaman sabitinin uzadığını düşünmekteyiz (Şekil 4.10.A). Bunun sonucunda şu an ki verilerimiz SR içeriğiyle ilgili net bir yorum yapmamızı engellemektedir. Bu duruma odaklanarak yapılacak bir çalışma ile oluşan soru işaretleri giderilmeye çalışılacaktır. SR üzerinde bulunan ve  $Ca^{2+}$ 'un geri alımında başat rol oynayan SERCA2a proteinin hızı, kafein indüklü transientin  $\tau$  değerinden 0 mV'da oluşan transientin  $\tau$  değerinin çıkarılmasıyla elde edilmektedir. Bahsedilen hesaplama göre DKM'de ( $2,10 \pm 1,6$  s)  $\tau$  değerinin artışına bağlı olarak SERCA2a fonksiyonunda yavaşlama, DKM+Ang 1-7 ( $0,97 \pm$

0,38 s) deney grubunda ise DKM'ye nazaran fonksiyonda hızlanma olduğu bilgisine ulaşılmıştır ( $K: 1,05 \pm 0,67$  s) (Şekil 4.10.E).



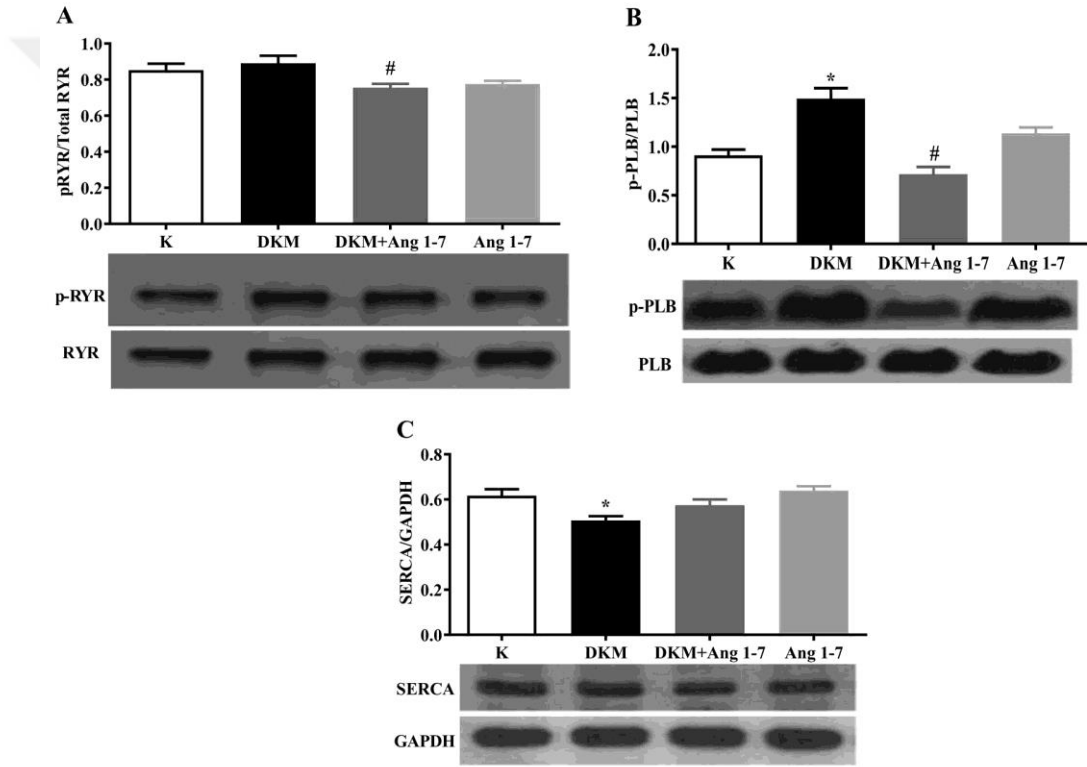
**Şekil 4.10.** Sodyum-kalsiyum değiştokuşçusu akımı ve eş zamanlı kafein indüklükalsiyum transientleri verileri. A) Deney gruplarının akım ve transient örnek kayıtları, B) Deney gruplarında elde edilen sodyum-kalsiyum değiştokuşçusu akımı yoğunluğu, C) Deney gruplarının protein ekspresyon değerleri, D) Deney gruplarının transient genliği verileri, E) Deney gruplarının SERCA2a aktivitesi verileri. \* $p < 0,05$  vs K grubu, # $p < 0,05$  vs DKM grubu.

#### 4.3.7. Diyabetik Kardiyomiyopati ve Anjiyotensin (1-7) Uygulamasının Sarkoplazmik Retikulum proteinleri Üzerine Etkileri

Hücre içi  $Ca^{2+}$  homeostazının korunması ve sürdürülebilir olmasının başrol oyuncusu SR'ın fonksiyonel yapısıdır. Bunu da sistol sırasında  $Ca^{2+}$  salınımını, diyastol sırasında da  $Ca^{2+}$  geri alınımını gerçekleştirerek sağlamaktadır. Dolayısıyla patofizyolojik durumlarda  $Ca^{2+}$  homeostazının bozulması bu dengenin bozulmasından dolayı kaynaklanmaktadır. SR  $Ca^{2+}$  salınımı RYR'yi oluşturan alt birimlerin birlikte açık konuma gelmesiyle oluşur. Bu proteinin fosforilasyonu fonksiyon değişimine neden olabilir. DKM'de ( $0,89 \pm 0,12$ ) K'ya ( $0,85 \pm 0,10$ ) göre bir artış bulgusuna ulaşılmış, ancak istatistiki olarak anlamlılık bulunamamıştır.

DKM+Ang 1-7'de DKM'ye ( $0,76 \pm 0,06$ ) kıyasla azalma eğilimindedir ve bu eğilim istatistiki olarak anlamlıdır. Dikkat çeken durum ise DKM+Ang 1-7'nin azalışının K ile kıyaslandığında istatistiki olarak anlamsız olmasıdır (Şekil 4.11.A).

SERCA2a'nın aktif hale gelebilmesi için PLB fosforillenmesi ve SERCA2a ile bağlantı kurması gerekmektedir. Dolayısıyla  $Ca^{2+}$  geri alınımının ilk basamağı PLB proteininden geçmektedir. Yapılan analizler sonucunda DKM'de ( $1,49 \pm 0,30$ ) K'ya ( $0,91 \pm 0,17$ ) kıyasla pPLB düzeyinde artış gözlenmiştir. Ang (1-7) ( $0,72 \pm 0,21$ ) uygulamasının ise diyabetik koşullarda gözlenen bu artışı engellediği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.11.B).



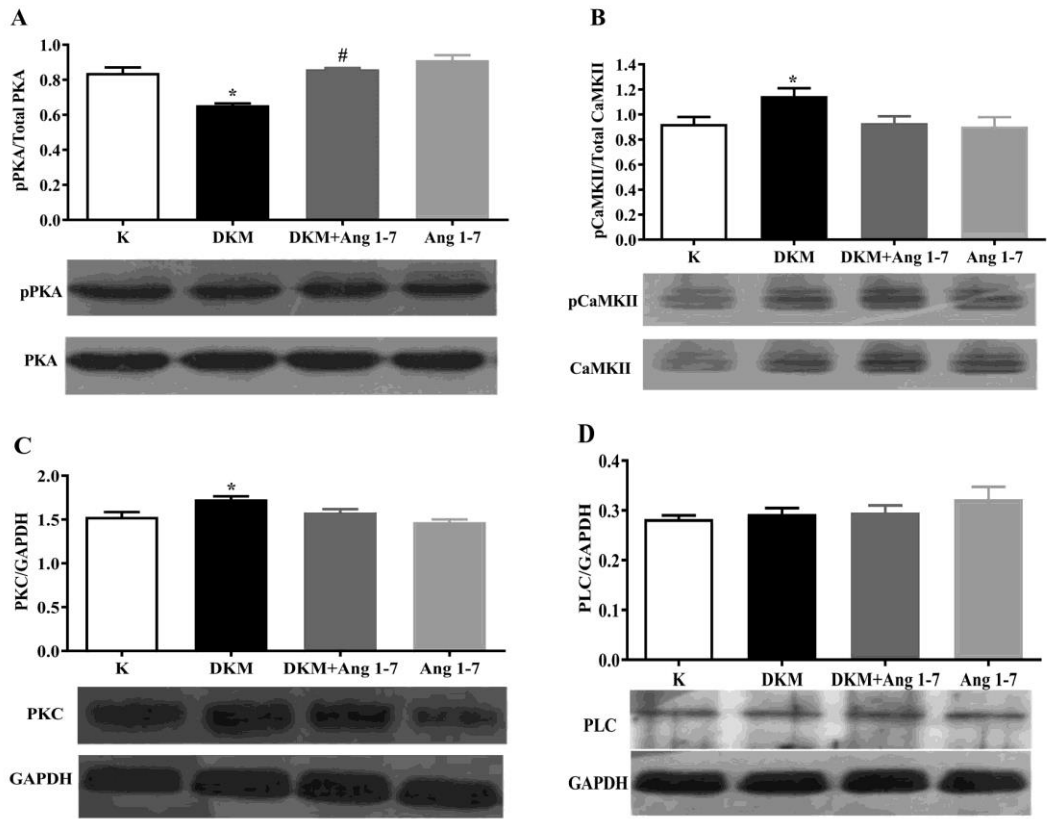
**Şekil 4.11.** DKM SERCA protein seviyesinde azalışa, pPLB seviyesinde ise artışa neden olmaktadır. DKM+Ang 1-7'de ise SERCA2a ve pPLB düzeyleri kontrol seviyelerindedir. Dolayısıyla DKM'de SERCA2a aktivitesi azalırken, Ang (1-7) uygulaması bu değişimi engellemiştir. Western-blot yöntemiyle elde edilen sarkoplazmik retikulum üzerinde bulunan kalsiyum düzenleyici proteinler. A) Deney gruplarından elde edilen ortalama pRyr/Ryr verileri, B) Deney gruplarından elde edilen ortalama pPLB/PLB verileri, C) Deney gruplarından elde edilen ortalama SERCA2a/GAPDH verileri. \* $p < 0,05$  vs K grubu, # $p < 0,05$  vs DKM grubu.

$Ca^{2+}$  geri alınımındaki ikinci basamağımızda doğal olarak SERCA2a proteindir. Yapılan çalışmanın neticesinde DKM ( $0,51 \pm 0,05$ ) durumunda bu proteinin ekspresyonunda azalış olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Diğer deney gruplarında bir

değişiklik gözlenmemiştir (K:  $0,62 \pm 0,08$ ; DKM+Ang 1-7:  $0,57 \pm 0,07$ ) (Şekil 4.11.C).

#### 4.4. Diyabetik Kardiyomiyopati ve Anjiyotensin (1-7)'nin Hücre İçi Kalsiyum Sinyal Yolağı Üzerine Etkileri

Kardiyomiyositlerde gerçekleşen hücre içi  $Ca^{2+}$  düzenlenmesi bir çok faktörün etki ettiği komplike bir süreçtir. Hipotezimiz çerçevesinde oluşturduğumuz modelin nasıl bir değişime neden olduğunu ve Ang (1-7)'nin etkisini belirlemek,  $Ca^{2+}$  homeostazındaki değişimleri açıklamakta önemli bir yer alacaktır.



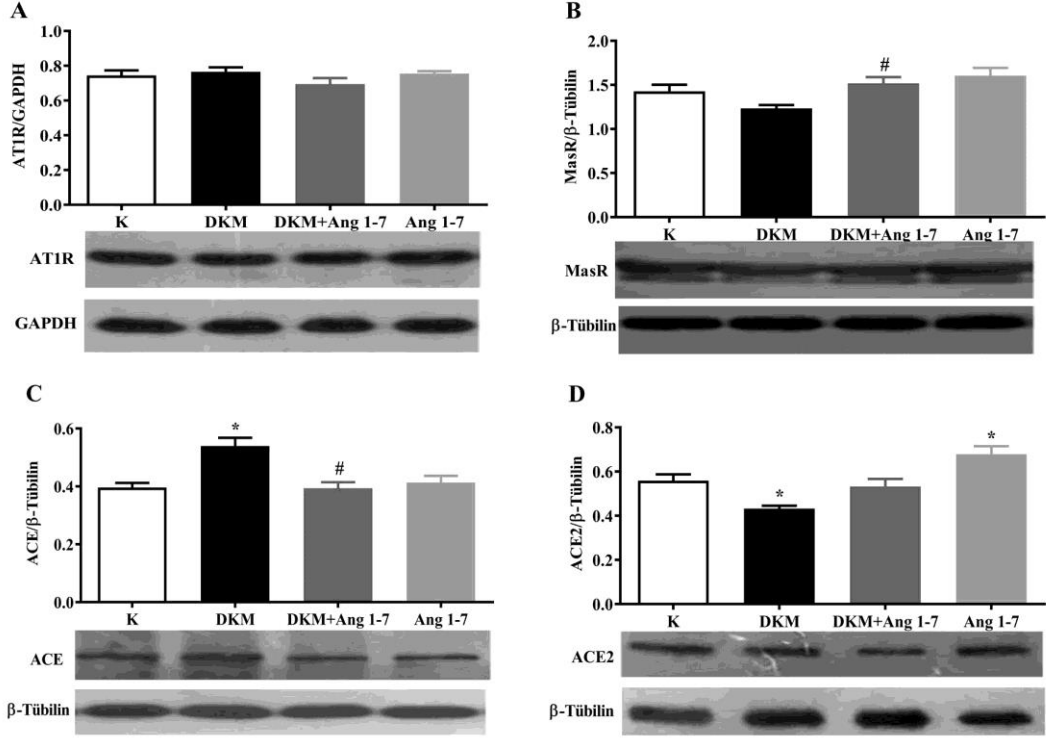
**Şekil 4.12.** DKM pPKA düzeyini azaltmış, pCaMKII ve PKC düzeyini arttırmıştır. Ang (1-7) uygulaması bu değişimleri engellemiştir. Hücre içi kalsiyum düzenlenmesi ve etkin sinyal yolağının belirlenmesi. A) Deney gruplarından elde edilen ortalama pPKA/PAK verileri, B) Deney gruplarından elde edilen ortalama pCaMKII/CaMKII verileri, C) Deney gruplarından elde edilen ortalama PKC/GAPDH verileri ve D) Deney gruplarından elde edilen ortalama PLC/GAPDH verileri. \* $p < 0,05$  K grubu, # $p < 0,05$  vs DKM grubu.

Bu çerçevede yapılan çalışmalar sonucunda DKM'nin pPKA/PAK düzeyini azalttığı, Ang (1-7) uygulamasının bu düzeyi K seviyelerine geri çekebildiği bulgusuna ulaşılmıştır (K:  $0,84 \pm 0,06$ ; DKM:  $0,66 \pm 0,02$ ; DKM+Ang 1-7:  $0,86 \pm 0,02$ ) (Şekil 4.12.A). SR proteinlerinin önemli bir fosforilleyicisi olan CaMKII için

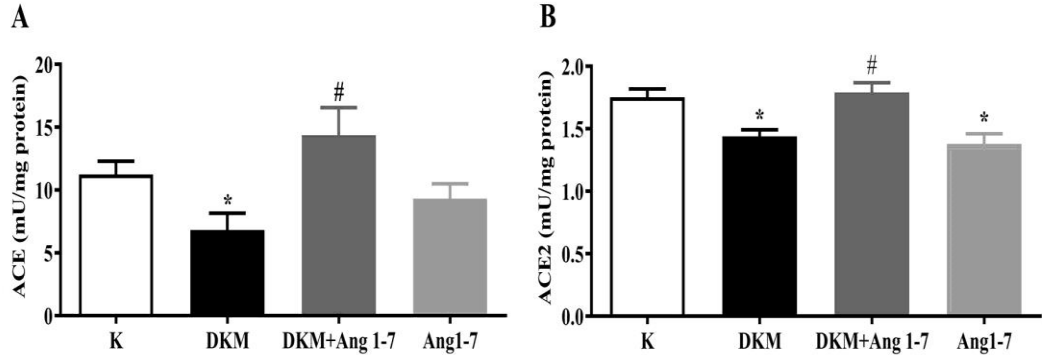
pCaMKII/CaMKII (K:  $0,92 \pm 0,14$ ; DKM+Ang 1-7:  $0,93 \pm 0,12$ ) parametresinde DKM'de ( $1,15 \pm 0,16$ ) bir artış bulgusuna ulaşılırken, DKM+Ang 1-7 grubunda bu tip bir artış gözlenmemiştir (Şekil 4.12.B). PKC/GAPDH parametresi DKM'de artarken, DKM+Ang 1-7'de bu artış meydana gelmemiştir (K:  $1,53 \pm 0,15$ ; DKM:  $1,73 \pm 0,09$ ; DKM+Ang 1-7:  $1,58 \pm 0,1$ ). PLC/GAPDH (K:  $0,28 \pm 0,020$ ; DKM:  $0,29 \pm 0,03$ ; DKM+Ang 1-7:  $0,30 \pm 0,04$ ) parametresinde ise deney grupları arasında farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.12.C ve D).

#### **4.5. Diyabetik Kardiyomiopati ve Anjiyotensin (1-7) Uygulamasıyla Lokal Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sisteminin Yeniden Düzenlenmesi**

RAAS'ın lokal fonksiyonlarının belirlenmesi ve Ang II'nin karşıt etkisine sahip olan Ang (1-7)'nin keşfi ve lokal RAAS'da etkin olduğunun bulunması, özellikle Ang II'nin karıştığı patolojilerin çözülebilmesi için umudu bir parça daha arttırmıştır. DKM'nin gelişiminde lokal Ang II'nin etkinliği daha önceleri yapılan çalışmalarda ispatlanmıştır. Dolayısıyla zıt etki gösteren Ang (1-7) molekülünün etkisinin nasıl olacağı merak uyandıran bir soru haline gelmiştir. Hipotezimiz doğrultusunda lokal RAAS sisteminin diyabetik koşullar altında nasıl değiştiğini ve Ang (1-7)'nin etkisinin hangi yönde evrildiğini tespit edebilmek için, bu sistemin elemanlarının protein seviyesi düzeyinde değişimleri incelenmiştir. Ang II'nin reseptörü olan AT1R incelendiğinde DKM'de K'ya göre bir değişim olmamış, DKM+Ang 1-7'de olan azalışın ise istatistiki olarak anlamlılık ifade etmediği anlaşılmıştır (K:  $0,75 \pm 0,06$ ; DKM:  $0,77 \pm 0,05$ ; DKM+Ang 1-7:  $0,70 \pm 0,07$ ) (Şekil 4.13.A). Ang (1-7)'nin bağlandığı öne sürülen MasR incelendiğinde diyabetik koşullar altında protein seviyesinde azalma gözlenmiş ancak istatistiki olarak anlamlı olmadığı anlaşılmıştır. DKM+Ang 1-7'de ise bu azalış istatistiki olarak anlamlı bir şekilde K seviyesine geri dönmüştür (K:  $1,43 \pm 0,2$ ; DKM:  $1,23 \pm 0,11$ ; DKM+Ang 1-7:  $1,52 \pm 0,2$ ) (Şekil 4.13.B). Diyabet durumunda artan ACE protein ekspresyonu, Ang (1-7) uygulaması sonucunda kontrol seviyelerine çekilebilmiştir (K:  $0,40 \pm 0,05$ ; DKM:  $0,54 \pm 0,08$ ; DKM+Ang 1-7:  $0,40 \pm 0,06$ ) (Şekil 4.13.C). Ang (1-7)'nin oluşumunda başat rol oynayan ACE2 protein ekspresyonu diyabetik koşullarda azaldığı görülmüştür. Diğer deney gruplarında ACE2 açısından K'ya göre bir farklılık yoktur (K:  $0,56 \pm 0,08$ ; DKM:  $0,43 \pm 0,04$ ; DKM+Ang 1-7:  $0,53 \pm 0,10$ ) (Şekil 4.13.D).



**Şekil 4.13.** DKM ACE protein seviyesinde artışa, ACE2 protein seviyesinde ise azalışa neden olmuştur. Ang (1-7) uygulaması bu değişimleri engellemiştir. Lokal renin-anjiyotensi sistemi verileri. A) Deney gruplarından elde edilen ortalama AGT1R/GAPDH verileri, B) Deney gruplarından elde edilen ortalama MASR/ $\beta$ Tübilin verileri, C) Deney gruplarından elde edilen ortalama ACE/ $\beta$ Tübilin verileri ve D) Deney gruplarından elde edilen ortalama ACE2/ $\beta$ Tübilin verileri. \* $p < 0,05$  vs K grubu, # $p < 0,05$  vs DKM grubu.



**Şekil 4.14.** DKM ACE ve ACE2 aktivitesini azaltmıştır. Ang (1-7) uygulaması ACE ve ACE2 düzeylerini kontrol seviyelerine yükseltmiştir. Lokal RAS enzim aktiviteleri. A) Deney gruplarından elde edilen ACE aktivite verileri ve B) Deney gruplarından elde edilen ACE2aktivite verileri. \* $p < 0,05$  vs K grubu, # $p < 0,05$  vs DKM grubu.

Bu bilgilere ilaveten ACE ve ACE2'nin enzim aktiviteleri de ölçülmüştür. Diyabet koşulları altında ACE aktivitesi kontrole kıyasla azaldığı gözlemlenmiştir. DKM+Ang 1-7'deki artış DKM'ye kıyasla istatistiki olarak anlamlı çıkmıştır (K:  $11,24 \pm 2,1$  mU/mg protein; DKM:  $6.82 \pm 2,7$  mU/mg protein; DKM+Ang 1-7:

14,35  $\pm$  4,4 mU/mg protein) (Şekil 4.14.A). ACE2 enzim aktivitesi DKM'de azalırken DKM+Ang 1-7'de bu azalış engellenebilmiştir. İlginç olan durum ise fizyolojik koşullar içerisinde uygulanan Ang (1-7)'nin de ACE2 aktivitesinde azalmaya neden olmasıdır (K: 1,75  $\pm$  0,13 mU/mg protein; DKM: 1,44  $\pm$  0,10 mU/mg protein; DKM+Ang 1-7: 1,79  $\pm$  0,16 mU/mg protein) (Şekil 4.14.B).



## 5. TARTIŞMA

*Diabetes Mellitus* çoklu organ yetmezliğine kadar uzanabilecek süreçleri oluşturma potansiyeline sahip endokrin sistem patolojisidir. Diyabet patofizyolojisinin temelini glukoz ve lipit metabolizmasının bozulması oluşturur. RAAS otokrin, parakrin ve/veya intrakrin etkileri göstererek hücresel düzeyde çoklu fizyolojik süreçlere katkı sağlamaktadır. RAAS'ın bu özellikleri insülin azalması ve direncinin gelişmesine neden olarak diyabet gelişiminde ve diyabete bağlı olarak ortaya çıkan ikincil patolojilerin meydana gelmesinde etkilidir. Yapılan çalışmalar Ang (1-7)'nin önemli bir anti-hiperglisemik etkiye sahip RAAS elemanı olabileceğini göstermektedir. Marcus ve ark. 2013 yılında yapmış olduğu çalışmada Ang (1-7)'nin T2DM'da insülin direncini azaltıcı yönde etki ettiği gösterilmiştir (Marcus ve ark., 2013). Buna ilaveten Santos ve ark. 2014'de yaptığı çalışmada da Ang (1-7) uygulamasının T2DM'de hipoglisemik etki yarattığı bulgusuna ulaşılmıştır (Santos ve ark., 2014). Ayrıca, Ang (1-7)'nin, GLUT 4 ekspresyonunu artırması ile glukoz alımının kolaylaştığı yönünde bilgi bulunmaktadır (Takeda ve ark., 2013). Çalışmamızda kullanılan insulin bağımlı diyabetik modelde gözlenen glukoz değerlerinde Ang (1-7)'nin bir iyileştirme etkisi tespit edilmemiştir. İnsülin taklit edici moleküller ya da iyonlar olabileceğine dair düşünceler olmasıyla birlikte, Ang (1-7)'nin bu tip bir davranışa sahip olmadığı söylenebilmektedir. Ayrıca hipotezimizi oluştururken kullandığımız STZ'nin pankreas  $\beta$  adacıklarını yok ederek insülin yoksunluğu oluşturmamasından dolayı Ang (1-7)'nin telafi edebileceği bir insülin kaynağının bulunmaması, çalışmamız dahilinde Ang (1-7)'nin glukoz metabolizması üzerine olumlu bir etkisinin gözlemlenememesinin nedenidir. Dolayısıyla, oluşan diyabetik koşullarda bir iyileşme olmamıştır.

Diyabetik hastalarda hipertansiyon görülme olasılığı aynı yaş grubunda diyabet olmayan kişilere göre iki kat fazladır. Bununla beraber, diyabetli hastalarda gelişen kardiyovasküler patolojilerin %75'i hipertansiyon ile ilgilidir (Sowers, 2003). Çalışmamızda sistolik kan basıncında ve ortalama arter basıncında DKM grubunda kan basıncı artış bulgusuna ulaştık. Ang (1-7) uygulaması sonucunda bu artışların engellendiğini gözlemledik. Bununla birlikte fizyolojik koşullar altında Ang (1-7) uyguladığımız deney grubunda ise her hangi bir hipotansif durumla karşılaşmadık. Ang (1-7) bu etkisini MasR üzerinden Akt yolağının aktivitesinin artışı sonucunda

eNOS ve dolayısıyla NO artışı (Sampaio ve ark., 2007), ya da PLA2/AA/PGE2 sonucunda cAMP artışıyla (Jaiswal ve ark., 1993) vazodilatasyon etkisini ortaya çıkararak gerçekleştirmektedir.

Deney hayvanlarından elde edilen EKG kaydı ile in vivo düzeyde kalbin elektriksel işlevini ortaya çıkarmak mümkündür. DM'un ventrikülün uyarılmasına, iskemi gibi ikincil bir olgu yoksa, en temel etkisi repolarizasyon süresinin uzamasıdır (Whitsel ve ark., 2005; Sorrentino ve ark., 2017). Elde ettiğimiz sonuçlar bu çıkarıma uygundur. Repolarizasyon süresini belirten QT parametresi DKM grubunda uzama gösterirken, Ang (1-7) uygulaması sözü geçen uzamayı engellemiştir. Bu duruma bağlı olarak kalp hızında yavaşlama gözlenmektedir. Repolarizasyon süresinin uzaması yeni bir uyarının oluşması dolayısıyla gerçekleşecek olan yeni döngünün geç başlamasına neden olmaktadır. Alınan kayıtların hiç birinde T segmentinde bu uzamaya bağlı gerçekleşebilecek olan aritmik (erken depolarizasyon sonrası uyarım (EAD) ve geç depolarizasyon sonrası uyarım (DAD) durumlarının hiçbirine rastlanmamıştır. Bununla birlikte her iki diyabet grubunda da R segmentinin genliğinde artış gözlenmektedir. Bu artışın diyabetten kaynaklı kas kaybının gerçekleşmesine bağlı olarak ortaya çıkan doku kaybı sonrasında transtorasik empedansın azalmasına bağlı olarak kayıt elektrotuna gelen sinyalin gücünün artmış olmasından dolayı gerçekleştiğini düşünmekteyiz.

DM'nin organ düzeyinde neden olduğu bu elektriksel aktivite değişiklikleri hücre düzeyinde de değişikliklere neden olmakta ve DM'den kaynaklı fonksiyon değişiklikleri etkisini hücre düzeyinde de göstermektedir. DM hücre düzeyinde uyarılma-kasılma çiftlenimini bozarak, önce kardiyomiyositin devamında da kardiyak dokunun elektriksel ve mekanik aktivitesinde değişimlere neden olmaktadır. Birçok çalışma diyabetik koşullarda AP repolarizasyon süresinin uzadığını söylemektedir (Raimondi ve ark., 2004). Bu uzamanın nedenlerinden birinin AP'nin erken repolarizasyon fazından sorumlu voltaja bağımlı  $K^+$  kanal akımı olan  $I_{to}$ 'da meydana gelen azalmanın olduğu bilinmektedir (Raimondi ve ark., 2004). Tek hücre kardiyomiyositlerinden akım kenetleme yöntemi ile ölçtüğümüz AP verilerimiz literatürü destekleyecek şekildedir ve DKM'de AP repolarizasyon süresinin uzadığına ve  $I_{to}$ 'nun azaldığına dair bilgilere ulaşılmıştır.  $I_{to}$ 'da gözlenen azalmanın nedeni birçok farklı biyokimyasal mekanizmada gerçekleşen

değişikliklerden kaynaklanabilmektedir. Hücre içi glukoz alımının (Li ve ark., 2005) ve kullanımının azalmasına bağlı olarak  $K^+$  kanal fonksiyonunun azalması (Xu ve ark., 1996) diyabetik koşullarda ilk akla gelenidir. İkinci olarak kanal proteinlerini patolojik değişimlerin etkisinden koruyan oksidasyon-redüksiyon sisteminin bozulması sonucu  $K^+$  kanal fonksiyonunun azalması (Rozanski ve Xu, 2002; Xu ve ark., 2002; Li ve ark., 2005) ve üçüncü olarak  $K^+$  kanalına özel mRNA sentezinin azalması (Qin ve ark., 2001) gösterilebilir. Ang (1-7) uygulamasının uzayan AP repolarizasyon süresini kısaltmasının başlıca nedeni DKM'de azalan  $I_{to}$ 'nun normal seviyeye dönmesi olarak ortaya konmuştur. Bu artışın nedenini anlamak için Western-Blot yöntemiyle protein miktarları ölçülmüş, sonuçta DKM'de azalan  $K^+$  kanal seviyesinin Ang (1-7) uygulaması ile arttığı bulgusuna ulaşılmıştır. Ang (1-7) diyabetik kalplerde oksidatif stres üzerine etkili bir molekül olduğunu ispatlamıştır (Yousif ve ark., 2012; Hao ve ark., 2015). Bu nedenden dolayı oksidasyon-redüksiyon sisteminin dengelenerek  $K^+$  kanal proteinlerinin korunması ve fonksiyonlarının artması da olası bir durumdur. Bulgularımız Ang (1-7)'nin  $K^+$  kanal miktarında artışa neden olarak, diyabetten kaynaklı AP repolarizasyon süresindeki uzamanın düzeltilmesine katkı sağladığını göstermektedir. AP'nin repolarizasyon fazında etkili bir diğer  $K^+$  akımı da  $I_{K1}$ 'dir. Zar potansiyelinin belirlenmesinin yanında üçüncü fazın şekillenmesinde de etkilidir.  $I_{K1}$  azalışı tıpkı  $I_{to}$ 'da olduğu gibi repolarizasyon süresinin uzamasına neden olmaktadır. Bu azalış hücre zarını daha uzun depolarize durumda kalmasını sağlayarak, AP sinyalinin dinlenim potansiyeline inşini geciktirecektir.  $I_{ss}$ 'in -120 ile -50 mV arası test edilerek  $I_{K1}$  değerlendirilmiştir. Bulgularımız DKM'de  $I_{K1}$ 'da azalış bulgusuna ulaşmıştır. DKM'de Ang (1-7) uygulamasının bu azalışı engellediği tespit edilmiştir. Ang (1-7)'nin başat faktör olan  $I_{to}$ 'nun yanında  $I_{K1}$ 'inde artışına neden olarak uzayan AP repolarizasyon süresinin kısaltılmasına katkı sağladığı düşünülmektedir. Sonuç olarak Ang (1-7)'nin DM kaynaklı kardiyak APD'nin uzamasını  $K^+$  kanal akımlarına etki ederek engellediği bulgusuna ulaşılmıştır.

AP'nin plato fazına etki ettiği gibi, hücre içi  $Ca^{2+}$  ve ilgili süreçlerin düzenlenmesine katkı sağlayan L-tipi  $Ca^{2+}$  akımının diyabetik durumda azaldığı bulgusuna ulaşılmıştır (Wang ve ark., 1995; Lu ve ark., 2007). Sıçan kardiyomiyositlerinde AP repolarizasyon süresinin uzamasına  $I_{CaL}$ 'deki azalışın doğrudan katkı sağlamadığı, olası  $Ca^{2+}$  bağımlı  $K^+$  akımlarının etkisi dışında asıl etkiyi  $I_{to}$ 'daki azalışın neden

olduğu bilinmektedir (Wang ve ark., 1995). Dolayısıyla  $I_{CaL}$  azalışı hücre içi  $Ca^{2+}$  homeostazı, kasılma ve hücre içi düzenleyici sinyallerin değişimine katkı sağlamaktadır. Voltaj kenetleme yöntemi ile elde ettiğimiz  $I_{CaL}$  bulgularımız literatürün de bahsettiği gibi diyabette düşmektedir. Bununla birlikte Ang (1-7) uygulamasının  $I_{CaL}$ 'deki azalışı engellediği gösterilmiştir. Aynı zamanda LVCC protein miktarları ölçülmüş ve DKM'de protein miktarında azalma gözlenmiştir. Ang (1-7) uygulamasında bu azalma bulgusuna rastlanmamıştır. Bu bilgilerin neticesinde hücre içine giren  $Ca^{2+}$ 'un azalışının Ang (1-7) ile engellendiği söylenebilir. Engellenen  $Ca^{2+}$  azalışı sayesinde DKM'de görülen kasılma bozukluklarının ve  $Ca^{2+}$  ile bağlantılı hücre içi sinyal aktivitelerinin toparlanma bulguları gösterebileceğine dair bir potansiyele ulaşılmıştır. Elde ettiğimiz LVCC verileride bu yorumumuzu desteklemektedir. DKM'de azalan LVCC miktarı, Ang (1-7) uygulaması sonucunda engellenmiştir. Bu durumun sonucunda DKM'de azalan  $I_{CaL}$ , Ang (1-7) ile toparlanma yönünde hareket edebilmiştir.

DM doku ve hücre düzeyinde uyarılma fonksiyonu üzerine gösterdiği olumsuz etkileriyle birlikte, kasılma fonksiyonlarında da değişikliklere neden olarak patofizyolojik durumun ilerlemesini sağlamaktadır. DKM fonksiyonel olarak iki tip fenotipe sahiptir. Diyabetik kardiyomiyopatinin ilk aşaması klinik olarak asemptomatiktir ve artmış fibroz ve sertlik ile karakterizedir. Erken diyastolik dolumun azalması, atriyal dolum ve genişlemede bir artışla beraber ayrıca yüksek bir sol ventrikül diyastolik basınç artışı gözlenir (Westermeier ve ark., 2016). DKM'nin ikinci aşaması, sol ventrikül hipertrofisi, kardiyak yeniden modelleme, ilerleyen kardiyak diyastolik disfonksiyon ve bunun sonucunda normal EF ile kalp yetmezliğinin klinik endikasyonlarının ortaya çıkması ile karakterizedir (Jia ve ark., 2016). DKM'nin ilerlemesi ile diyastolik fonksiyon bozukluğu ve azalmış kardiyak kompliyans ve nadiren azalmış kompliyansa eşlik eden sistolik fonksiyon bozukluğu meydana gelebilir. Bu da EF'nin azalmasına, uzun süreli ön ejeksiyon performansına, genişlemiş bir sol ventrikül odacığına, kısaltılmış ejeksiyon süresine ve son olarak artmış dolum basıncının eşlik ettiği doluma karşı artan dirence neden olur.

Diyastolik fonksiyon iki aşamada değerlendirilmektedir. Bunlardan ilki pasif releksasyon değerlendirmesidir. Bu değerlendirme içerisinde hipertrofi ve

kompliyans parametreleri değerlendirilir. T1DM'de yapılan bir çalışmaya göre hipertrofi bulgusunun gözlenmediği bildirilmiştir (Kanamori ve ark., 2015). Bizim bulgularımız da bu değerlendirmeye uyumludur. Diyastolik fonksiyon bozukluğunda kompliyans azalmaktadır. Kompliyans azalışı EDV'nin kontrole göre sola kayması ve izovolumetrik kasılma öncesindeki EDP'nin artmasıyla tanımlanmaktadır. DKM grubunda gözlenen verilerimiz bu özellikleri desteklemektedir ve düşük kompliyansa sahip olduğu gösterilmiştir. DKM+Ang 1-7 grubunda ise izovolumetrik kasılma öncesi EDP'de artış olmasına rağmen asıl belirleyici olan EDV kontrole göre azalmamıştır. Hatta kontrole göre artış göstermektedir. Kompliyans ventriküler sertlik ile ters orantılıdır. Ventriküler sertliğin dolayısıyla da kompliyans azalışının nedeni doku içerisinde kollojen birikimi ve fibrozis gelişmesidir. Ang (1-7) uygulamasının diyabetik kardiyak dokuda kollejen birikimini ve fibrozisi engellediği gösterilmiştir (Singh, Singh ve ark., 2011; Papinska ve ark., 2016). DKM+Ang 1-7 grubundaki kompliyans azalışının DKM'ye göre gerilemiş olmasının nedeni olarak, Ang (1-7)'nin anti-fibrotik ve anti-inflamatuar özellikleri gösterilebilir. Diyastolik fonksiyon bozukluğunun belirlerlenmesinde incelediğimiz ikinci olgu aktif relaksasyondur. Temelde izovolumetrik gevşeme değerlendirilmektedir. Buna bağlı olarak DKM'de aktif relaksasyon süresinin uzadığını söyleyebiliriz (Şekil 4.4.D). Ang (1-7) uygulaması bu uzamayı azaltmıştır. Aktif relaksasyon süresinin uzaması sol ventrikül odacık gevşemesinin uzadığını ya da tamamlanamadığını gösterir. Bu tip bir eksiklik sonucunda gevşeme-kasılma süreçleri boyunca yeterli kan hacmi sol ventriküle dolamayacak ve sol ventrikülden gönderilemeyecektir. Bununla birlikte sempatik aktivitedeki bir artış sonucunda yeterli kan hacminin gönderilememesine bağlı olarak kalbin de içerisinde olacağı organ perfüzyonlarında bozulmalar gerçekleşecektir. Bu tip bir bozulma kardiyak dokuda iskemik hasara yol açabilecektir. DKM'de gözlenen bu bozulmanın da Ang (1-7) ile düzeldiği gözlenmiştir.

Temelde kardiyovasküler sistemin fonksiyonu Frank-Starling yasasını korumak ve sürdürülebilirliğini sağlamaktır. Bu yasa uyarınca kalbe venöz sistemle geri dönen kan hacmini karşılayacak şekilde aorta'ya kan gönderilmelidir. Bunun için de kalbin inotropik özelliğinin korunması önemlidir. SW, CO ve SV verilerine göre DKM'de bu fonksiyon bozulmuştur (Radovits ve ark., 2009). Kalpten aorta'ya daha az kan hacmi yollanmaktadır. Bunun iki nedeni olabilir. Bunlardan ilki kontraksiyonun

azalmasıdır. Bu durumu değerlendirmek kardiyomiyositlerden aldığımız kısalma ölçümleri sonucunda, DKM grubunda  $L/L_0$  parametresinin azaldığı bulgusu bu olguyu hücre düzeyinde desteklemektedir. İkincisi ise venöz dönüşde azalmadır. Venöz dönüşün azalmasına kalbe gelen kan hacminden daha azının vasküler sisteme gönderilmesi sonucu sol ventrikül dolumuna daha az hacimde kan gelmesinin yanında, kan dolum hızının da azalması katkı sağlamaktadır. Bu durumun nedeni de relaksasyon kısmında sol ventrikül odacığının gevşemesinin uzaması ya da tamamlanamamasına bağlı olarak kontraksiyon öncesi dolum için yeterli sürenin kalmamasıdır. DKM’de sol ventriküle gelen kan hacminde  $[EDV+SV]$  ve  $dP/dt$ ’de azalma bulgularına ulaşılması, yukarıda venöz dönüş ile alakalı bahsettiğimiz iki durumun da gerçekleştiğini söylemektedir. Buna ilaveten SV azalmasına bağlı olarak ön yükün artması sol ventrikülde bulunan kan hacminin yeterli miktarda aorta’ya gönderilemediğini de düşündürmektedir. DKM’de gözlenen  $E_a$  artışı aorta’nın kompliyans yeteneğinde azalma, sonuç olarak aort içi basıncın artışına neden olduğunu işaret etmektedir. Bu iki olgu birlikte düşünüldüğünde DKM’de ventriküler göllenme olasılığı kasılmanın bozulmasıyla birlikte artmaktadır. Dolayısıyla DKM kasılma bozukluğuna ve venöz dönüşün azalmasına neden olarak inotropiyi negatif yönde değiştirir.

Ang (1-7) uygulaması kardiyomiyosit düzeyinde  $L/L_0$ ’ı arttırarak, kontraksiyon bozulmasını düzeltir. SW, CO ve SV parametrelerini K seviyelerine getirerek inotropik etkiyi korumayı başarır. Ayrıca SV artışı ve  $E_a$ ’daki azalış sayesinde ön yük artışını engelleyerek sol ventriküle gelen hacmin gönderilmesini kolaylaştırır. İzovolumetrik gevşeme ve sol ventrikül basınç değişim hızını düzelterek diyastolik ayağın (lusitropi) korunmasını sağlar. Bunlara ilaveten dolum hacminin de artması Frank-Starling yasasının korunduğunu göstermektedir. Bu bilgilere dayanarak DKM’de görülen diyastolik fonksiyon bozukluğunu, Ang (1-7) uygulamasının düzelttiğini söyleyebiliriz.

DKM kalbin mekanik (toplam) enerjisinin  $[PVA=SW+PE]$  azalmasına neden olmaktadır. Enerji eksikliği hücresel solunum aracılığıyla ATP üretiminin azaldığını düşündürmektedir. Bu durumun nedeni diyabet koşullarında gözlenen glukoz ve lipid metabolizmasının bozulması olabileceği gibi, moleküler  $O_2$  yoksunluğundan da kaynaklanabilmektedir.

DKM'nin ilerleyen safhalarında diyastolik fonksiyon bozukluğunun yanında sistolik fonksiyon bozuklukları da oluşabilir. Sistolik fonksiyon bozukluğu organ perfüzyonunda azalmaya neden olacağından, yetmezlik bulgularının oluşmasına ve gelişmesine katkı sağlayacaktır. Kardiyak doku özelinde düşündüğümüzde yeterli kan hacmiyle muhatap olunamaması metabolik süreçlerde değişime neden olarak enerji üretimi eksikliğine, glukoz ve lipid metabolizmasındaki yan ürünlerin artışına neden olarak homeostatik dengenin bozulmasına, moleküler O<sub>2</sub> azalması nedeniyle iskemik olguların gelişmesine neden olacaktır. Ayrıca daha az hacimde kanın arteriyal dolaşıma dönmesi, venöz dönüşün azalmasına neden olarak Frank-Starling'in bozulmasını sağlayacaktır. P-V loop metodolojisi kullanılarak bu olgu değerlendirildiğinde CO, SV ve %EF'nin azalması sistolik fonksiyon bozukluğunun belirleyicilerindendir. Bulgularımız DKM grubunda CO, SV ve %EF'nin azaldığını göstermektedir. Ang (1-7) uygulaması CO, SV ve %EF'de düzelme sağlamıştır. Bu durum göz önüne alındığında Ang (1-7) molekülünün DM kaynaklı olası sistolik fonksiyon bozukluğunu ve bu fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak gelişecek ikincil etkileri engellediği söylenebilmektedir.

Yukarıda bahsedilen bilgilere dayanarak DKM'de gözlenen diyastolik fonksiyon bozukluğunu Ang (1-7) uygulaması tedavi edebilmekte ve doku düzeyinde fonksiyonu korumaktadır.

Doku düzeyinde gözlenen bu fonksiyon bozukluğu yukarıda da tartışıldığı gibi, hücre içi Ca<sup>2+</sup> homeostazının bozulmasını takiben hücre düzeyinde kasılmanın değişime uğramasıyla ilişkilidir. Dolayısıyla CICR mekanizmasının dengesinin ve olası değişimlerinin önemli etkilere sahip olabileceğini söylemek doğru bir tespit olacaktır. Verilerimiz doğrultusunda DKM grubunda I<sub>CaL</sub> azalımının ve bu azalmanın nedeninin LVCC'nin protein miktarında düşüşün gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır. Bu değişimin CICR'de değişimlere neden olarak hücre içi Ca<sup>2+</sup> homeostazında, kasılma fonksiyonunda ve nihayetinde organ düzeyinde fonksiyon bozukluklarına neden olacağı tahmin edilmektedir.

Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda diyastolik fonksiyon bozukluğu gelişmiş DKM'de, hücre düzeyinde de diyastolik sürecin değişime uğraması beklenmektedir. Hücre düzeyindeki diyastolik süreç bazal Ca<sup>2+</sup> miktarı ve relaksasyonda Ca<sup>2+</sup>'un hücre içerisinden uzaklaştırılmasıyla değerlendirilir. Verilerimiz DKM'de bazal Ca<sup>2+</sup>

miktarının arttığını göstermektedir. Bu durum SR sızıntılarından dolayı meydana gelebileceği gibi sistol sonrası  $Ca^{2+}$  uzaklaştırmasında meydana gelen değişimlerden dolayı gerçekleşebilmektedir.  $Ca^{2+}$  geri alım süresi DKM grubunda uzamaktadır. Bu uzama hücre içi  $Ca^{2+}$  ana deposu olan SR'ın  $Ca^{2+}$  içeri alımından sorumlu alt birimi olan SERCA2a'nın fonksiyonunda oluşacak değişimlerden kaynaklanması en olası nedendir. SERCA2a işlevini aktivitesinin düzenlenmesinden sorumlu PLB ile yerine getirmektedir. PLB fosforillenmesi sonrası SERCA2a aktifleşir ve SR içerisine  $Ca^{2+}$  alımı gerçekleşir. İncelemelerimiz sonrasında DKM grubunda SERCA2a protein miktarında azalma, fosforile PLB'de ise artma bulgularına rastlanıldı. Literatürde PLB'nin azaldığını söyleyen bilgilere rastlanmaktadır. Ancak ilgili koşullarda SERCA2a bulgusu değişim göstermemiş ve aktivite azalışı PLB aktivitesindeki azalışdan dolayı kaynaklanmıştır. Bizim bulgularımızda hali hazırda SERCA2a miktarının azalışı PLB değişmemiş ya da artmış olsa bile SERCA2a aktivitesinde azalışa neden olacaktır. Bununla birlikte bu proteinin kinetik durumu incelendiğinde protein bulgularıyla paralel bir şekilde SERCA2a kinetiğinin yavaşladığı bulgusu gözlenmektedir. PLB aktivitesinde bir artış olmasına rağmen, SERCA2a proteinindeki azalış,  $Ca^{2+}$  geri alım süresindeki uzama SERCA2a kinetiğinde yavaşlama, sonuç olarak fonksiyonun düştüğünün göstergesidir. PLB fosforilasyonu artsa da, aktifleştirecek SERCA'nın yeteri düzeyde olmaması SR içerisine  $Ca^{2+}$  alımının azalmasına neden olacaktır. Ang (1-7) uygulaması DKM'de gözlenen SERCA2a azalışını engellemiştir. PLB düzeyini de kontrol seviyelerinde tutmayı sağlamıştır. Bu bilgilerin yanında SERCA2a aktivitesinin azalmasını da engelleyerek diyastolik  $Ca^{2+}$  düzeyini toparlamayı sağlamıştır. Dutta ve ark. SERCA2a aktivitesindeki azalışın PKA aktivasyonundaki azalmaya bağlı olduğunu ve PKA toparlamasının SERCA2a aktivasyonunu iyileştirebileceğini göstermiştir (Dutta ve ark., 2002). DKM+Ang 1-7 grubundaki SERCA2a toparlanmasının nedeninin DKM durumunda azalan pPKA düzeyinin, Ang (1-7) uygulaması sayesinde toparlanması olarak gözükmektedir.

SR sızıntısı da bazal  $Ca^{2+}$  miktarını değiştirebilmektedir. Bu durum SR  $Ca^{2+}$  içeriğinin değişmesine ve sistol sırasında dökülen  $Ca^{2+}$  miktarının azalmasına, dolayısıyla da hücre düzeyinde kılalmanın küçülmesine neden olmaktadır. Bulgularımız DKM'de kılalma boyunun küçüldüğü ve dökülen  $Ca^{2+}$  miktarının azaldığını göstermektedir. Dökülen  $Ca^{2+}$ 'un azalışı geri dönen  $Ca^{2+}$ 'un azalmasından

ya da SR sızıntısından dolayı kaynaklanmaktadır. Yukarıda tartışıldığı üzere DKM’de SR içerisine alınan  $Ca^{2+}$  geri dönüşü azalmıştır. Ayrıca Yaras ve ark. (Yaras ve ark., 2005) yapmış olduğu çalışma diyabet koşullarında kardiyomiyositlerde SR sızıntısında artışın olduğunu göstermiştir. Sistolik fazda kullanılacak  $Ca^{2+}$  miktarındaki azalışa bağlı olarak DKM’de kontraksiyon boyu küçülmüştür. Bu durum sistolik  $Ca^{2+}$  azalmasıyla birlikte, kasılma makinesinin  $Ca^{2+}$ ’a karşı duyarsızlaşmasından dolayı da gerçekleşebilmektedir. PKC aktivasyonuna bağlı olarak troponin I ve T’nin fosforillenmesi sonucu  $Ca^{2+}$ ’un bağlanacağı troponin C bölgelerinin kapandığı ve kasılma işlevinin azaldığı gösterilmiştir. DKM grubunda elde ettiğimiz PKC artışı kasılma boyunun küçülmesinde bu yolağın da etkin olabileceğini düşündürmektedir. Ang (1-7) sayesinde PKC aktivitesindeki azalış ile birlikte kasılma makinesinin  $Ca^{2+}$  duyarsızlığı da azalmıştır. Bununla beraber Ang (1-7) SERCA2a fonksiyonunu arttırarak geri dönüşü arttırmış ve diyastol durumunda sitozolde  $Ca^{2+}$  birikimini engelleyerek kasılmanın fizyolojik sınırlar içerisinde bulunmasına katkı sağlamıştır. Ayrıca DKM’ye nazaran dökülen  $Ca^{2+}$  miktarını arttırarak da kasılma boyunda artışa neden olmuştur.

Dökülen  $Ca^{2+}$  artışının yanında RYR’nin  $Ca^{2+}$  senkronizasyonunu sağlaması da  $Ca^{2+}$  homeostazisinin devamlılığı için önemlidir. Senkronizasyon bozukluğu RYR’nin aksesuar proteinlerinin miktarsal ya da fonksiyonel değişikliklere uğramasından dolayı kaynaklanmaktadır. PP1, I-1, spinofilin, kalsinörin gibi proteinlerin fonksiyonel azalışları ya da RYR’den delokalize olmaları soncunda RYR kanalının açık ve kapalı konumundaki sabitliğinin korunamaması kanalın hiper ya da hipofosforilasyonu ile  $Ca^{2+}$  sızıntılarının meydana gelmesi ve bu durumu takiben senkronizasyon işleminin bozulmasıdır (Weber ve ark., 2015). Şu anki bilgiler PKA, PKC, CaMKII aktivitelerinin ve  $[Ca^{2+}]_i$  miktarının PPs ve I-1 fonksiyonlarında değişime neden olarak  $Ca^{2+}$  salınımı ve senkronizasyon üzerine etkilerinin olabileceğini göstermektedir ( Nicolaou ve Kranias 2009; Reiken ve ark., 2003; Lehnart ve ark., 2009). Elde ettiğimiz veriler RYR fosforilasyonu ya da defosforilasyonunun I-1 ve PP1 aktivitesiyle alakalı olmadığını göstermektedir (Weber ve ark., 2015). Ancak RYR aksesuar proteinlerinin azalışı ya da delokalizasyonunun RYR senkron bozukluklarına neden olabileceği ve olası bu durumun  $Ca^{2+}$  homeostazının etkili düzenleyicileri olan PKA, PKC ve CaMKII’nin aktivitelerindeki değişimlerden etkilenebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

DKM SR fonksiyonu üzerine etkisini CICR dengesini bozarak göstermektedir. Bunun sonucunda kasılma bozuklukları meydana gelmektedir. Çalışmamız Ang (1-7) uygulamasının bu fonksiyon bozukluklarını DKM’de değişen PKA ve PKC aktivitelerinin toparlanmasını sağlayarak etkisiz hale getirdiğini göstermiştir.

Lokal RAAS kardiyovasküler patolojilerde etkin rol oynamaktadır. Özellikle DKM’de Ang II/AT1R yolağının etkisi ve prognoza olan katkısı iyi tanımlanmıştır (Malhotra ve ark., 1997; Dandona ve ark., 2003; Westermann ve ark., 2007a; Westermann ve ark., 2007b; Zhou ve ark., 2008, Lee ve ark., 2014). Bu yolağın aktivasyonundaki artış kollojen birikimi ve fibrozis oluşumuna; ROS artışına neden olarak oksidatif strese; ERK1/2, p-38/MAPK gibi yolakların regülasyon artışına neden olarak inflamasyon artışına; glukoz ve lipit metabolizmasını bozarak enerji üretiminde eksikliğe yada ilerlemiş glukoz son ürünleri (AGEs) gibi metabolik yan ürünlerin birikmesiyle hücre içi homeostazın bozulmasına neden olmaktadır. Bunun yanında işlevi uyarılma ve kasılma fonksiyonlarıyla temellenen kardiyomiyosit gibi bir hücre tipinde uyarılma bozukluklarına ve ardından kasılma bozukluklarına neden olmaktadır.

Hücre düzeyindeki bu değişimler etkilerini dokuya yansıtmakta, dolayısıyla dokunun fonksiyonunda bozulmalar meydana gelmektedir. Hipertorfi ve ileti özelliklerinin bozulması erken safhada ilk gözlenen değişikliklerdir. İlerleyen safhalarda Frank-Starling yasasının dengesinin değişimiyle diyastolik fonksiyon bozukluklarına, %EF’si korunmuş diyastolik fonksiyon bozukluğuna sahip kalp yetmezliğine ve nihayetinde sistolik fonksiyon bozukluğuna sahip kalp yetmezliğine kadar gelişebilen bir sürecin meydan gelmesi söz konusu olacaktır.

Bütün bu değişimlerin olmasını sağlayan ACE/Ang II/AT1R aktivasyon artışı, dolayısıyla bu yolak proteinlerinin miktarlarında ve/veya aktivasyonlarında gerçekleşen artışlardır. ACE2/Ang (1-7)/MasR yolağının kısmen de olsa ortaya çıkarılması ve fonksiyonlarının tanımlanması bu duruma olan bakış açısını değiştirmiştir. Yukarıda bahsettiğimiz patofizyolojik değişimlerin gerçekleşmesinde ACE/Ang II/ATR yolağının artmasının yanında, ayrı ya da birlikte ACE2/Ang (1-7)/MasR yolağının ya da bu yolaktaki bir basamağın baskılanmasının da patofizyolojik süreçlere etki edebileceği yönünde düşünceler ortaya çıkmaktadır.

Elde ettiğimiz sonuçlar diyabetik koşullarda kardiyak dokuda ACE miktarının arttığını ve ACE2 miktarının azaldığını göstermektedir. Bunun sonucunda Ang II miktarı artabilecek ve ACE2 baskılanmasından dolayı da Ang (1-7) üretimi baskılanacaktır. İlginç olan ise DKM'de ACE ve ACE2 enzim aktivitelerinde gözlenen azalmadır. Çünkü beklenen ACE aktivitesinde artış dolayısıyla da Ang II üretiminin artmasıdır. Bu durumda DKM'de gözlenen ACE/Ang II/AT1R yolağının aktivasyonundaki artış soru işareti oluşturmaktadır. Zhang ve ark. 2008 yılında yaptıkları çalışma STZ ile indüklenen diyabet hayvanlarında DKM gelişimi sonrasında Ang I ve Ang II miktarında artış bulgusuna ulaşmışlardır (Zhang ve ark., 2008). Bununla birlikte yapılan çalışmalar DKM'de kardiyak dokuda tespit edilen Ang II'nin %75'lik düzeyinin kardiyak dokuda sentezlendiği ve plazma konsantrasyonunda bir artışa rastlanılmadığı bilgisine ulaşılmıştır (De Mello ve Danser, 2000). Sonuçta ACE miktarında ve Ang II düzeyinde artış gözlenmektedir. DKM'de ACE2 miktarı ve enzim aktivitesi azalmaktadır. ACE2 afinitesi Ang I'e nazaran Ang II'ye 400 kat fazladır. Dolayısıyla bu azalma Ang (1-7) üretimini azaltacak ve ACE2/Ang (1-7)/MasR yolağının baskılanmasına ve dengenin ACE/Ang II/AT1R yolağı tarafına kaymasına neden olacaktır. Yukarıda bahsedilen soru eksik sorulmuş bir soru olarak düşünülebilir. Çünkü ACE/Ang II/AT1R yolağının regülasyonunun artmasının yanında ACE2/Ang (1-7)/MasR yolağının da baskılanmasının DKM oluşumuna önemli bir katkı vermesi bakış açısının eksik olduğunu göstermektedir. Aslında bir tarafın aktive edilmesinin dışında diğer tarafın baskılanmasının da en azından eşit derecede önemli olduğu görülmektedir. Bu sorunsalı açıklayabilmek için DKM durumunda Ang (1-7) uygulamasını değerlendirmek doğru bir yaklaşım olacaktır.

Diyabetik kardiyak dokuda Ang (1-7) artışının sağlanması ACE miktarında azalışa, ACE2 miktarında ise kontrol seviyelerine kadar artışa ve ACE2 enzim aktivitesinin artışına neden olmaktadır. Bu durum bozulmuş dengenin yeniden oluşturulabilmesi için regülasyonu azalan tarafın her basamağında artış sağlanması yönündedir. ACE azalmasına bağlı olarak Ang II üretimi baskılanacak. ACE2 artışı hem Ang (1-7) oluşumunu arttıracak hem de bir başka anjiotensin türevi olan Ang (1-9) artışını tetikleyerek dolaylı olarak Ang (1-7) artışını sağlayacaktır. DKM+Ang 1-7 grubunda ACE aktivitesindeki artış bu önermemize katkı sağlamaktadır. Ancak bu artış diyabetin Ang (1-7) uygulamasıyla birlikte gelişen iyileştirici süreçlere karşı kendi

fonksiyon değişikliklerini korumak için bir hamle olarak da değerlendirilebilir. Bu karmaşı Ang II ve Ang (1-9) miktarlarının ölçölmesiyle cevaplanabilir. Olası Ang (1-9) artışı gözlenirse, Ang (1-7) üretiminin artması için regüle olduğu söylenebilir. Eğer Ang II düzeyinde artış olursa diyabetik koşulların karşı bir hamlesi olarak değerlendirilir. Bunun yanında Ang (1-7) uygulamasıyla MasR miktarında da gözlenen artış, DKM'de gözlenen görece azalışa karşı bir hamle olarak kabul edilebilir. Bu sayede ACE2/Ang (1-7)/MasR yolağının her basamağında aktivite artışı meydana gelerek dengenin yeniden oluşturulması sağlanmaktadır

Lokal RAAS birçok aktif elemana sahip karşılıklı bir denge içerisinde çalışan hormonal bir sistemdir. Patofizyolojik süreçlerin ilerlemesine bağlı olarak bozulan denge bir tarafa kaymakta ve sistem bozulmaktadır. DKM'de Ang II artışının nedeni de ACE2 azalışını takiben aktivitesi azalsa da miktar artışına bağlı olarak ACE'in devreye girmesidir. Bunun yanında Ang (1-7) üretiminin de azalması sonucunda ACE2/Ang (1-7)/MasR yolağının baskılanmasından dolayı ACE/Ang II/AT1R yolağı daha etkin hale gelmektedir. Sonuçlarımız değişimde merkezi oyuncunun ACE2 miktarı ve aktivitesindeki değişim olduğunu vurgulamaktadır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda STZ ile oluşturulan DKM patolojisi üzerine kronik olarak uygulanan Ang (1-7)'nin organ ve hücre düzeyindeki etkileri ve olası bu etkilerin mekanizmaları araştırılmıştır. Çalışmamız sonucunda aşağıda maddeler halinde özetlenen bulgulara ulaşılmıştır;

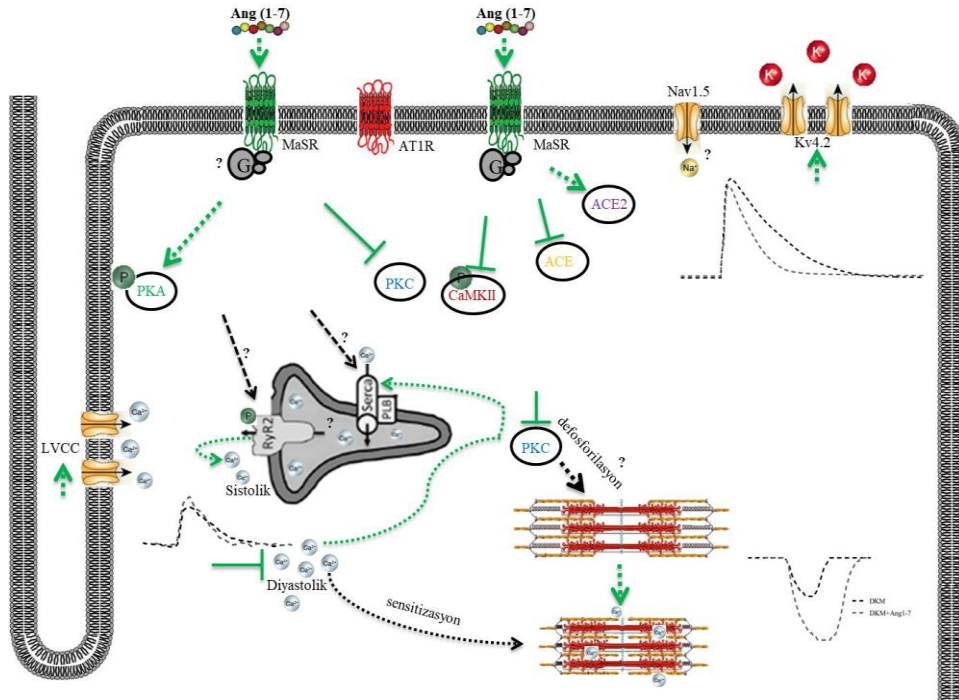
- 1) Diyabetten dolayı sistolik ve ortalama kan basıncında artış gözlenmiş, Ang (1-7) uygulaması ile bu artış engellenmiştir.
- 2) DM kardiyak dokuda ventrikül repolarizasyon süresinde uzamaya neden olarak EKG'nin QT intervalini uzatmıştır. Ang (1-7) uygulaması gözlenen bu uzamayı engellemiştir.
- 3) DM hücre düzeyinde AP repolarizasyon süresinde uzamaya neden olmuştur. Ang (1-7) uygulaması bu uzamayı engellemiştir.
- 4) DM  $I_{to}$  ve  $I_{K1}$  akım yoğunluklarında azalışa neden olmuştur. Ang (1-7) uygulaması bu azalışı engellemiş ve değerleri kontrol seviyelerine çekmiştir. Kv4.2 protein düzeyi DKM'de azalmış, ancak DKM+Ang 1-7'de kontrol seviyelerine ulaşmıştır.
- 5) DM sol ventrikül hemodinamik fonksiyonu değiştirerek diyastolik fonksiyon bozukluğunun meydana gelmesini sağlamıştır. Ang (1-7) uygulaması %EF, SW, CO, SV, PVA ve  $dP/dt$ 'de artış, Ea ve  $\tau$ 'da azalış göstererek meydana gelen diyastolik fonksiyon bozukluğunun düzelmesini sağlamıştır.
- 6) DM hücre seviyesinde, sarkomerik kısalma boyunu azaltarak ve kısalma kinetiklerini yavaşlatarak kontraksiyonu bozmuştur. Ang (1-7) uygulaması kısalma boyundaki bu azalışı engelleyerek kasılmanın toparlanmasına katkı sağlamıştır.
- 7) DM  $I_{CaL}$  akım yoğunluğunda azalmaya neden olmuştur. Ang (1-7) uygulaması bu azalış oranını düşürmüştür. DM LVCC protein seviyesinde azalmaya neden olurken, Ang (1-7) uygulamasında bu azalış gözlenmemiştir.
- 8)  $Ca^{2+}$  geri alımı ve geri alım hızında azalma DKM'de diyastolik serbest  $Ca^{2+}$ 'un artışına neden olmaktadır. Ang (1-7) uygulaması SERCA2a protein miktarını ve aktivitesini arttırarak geri alımı toparlamış, sonuç olarak diyastolik  $Ca^{2+}$  miktarı azalmıştır.
- 9) DM sistolik  $Ca^{2+}$  salınımını azaltmıştır. Ang (1-7) uygulaması azalışı yavaşlatmıştır.

10) DM hücre içi  $Ca^{2+}$  düzenlenmesinde önemli etkileri olan PKA, PKC ve CaMKII proteinlerinin aktivitelerinde değişikliklere neden olmuştur. Ang (1-7) uygulaması bu değişimleri engelleyerek bozulan  $Ca^{2+}$  homeostazını düzeltmiştir.

11) DM lokal RAAS elemanlarından ACE düzeyini arttırırken, ACE2 düzeyini azaltarak fonksiyonda değişime neden olmuştur. Ang (1-7) uygulaması bu değişimleri engellemiştir. Ayrıca Ang (1-7) uygulaması lokal RAAS elemanlarından olan MasR düzeyinde de artışa neden olmuştur.

12) DM ACE2 enzim aktivitesini baskılamıştır. Ang (1-7) uygulaması patofizyolojik koşullar altında bu aktiviteyi arttırmıştır.

Ang (1-7) uygulaması, organ ve hücre düzeyinde DM'nin yaratmış olduğu fonksiyon bozukluklarında iyileşmeye neden olmuştur. Bu veriler göz önüne alındığında, Ang (1-7) molekülünün ve dahil olduğu ACE2/Ang (1-7)/MasR yolğunun diyabet koşullarında gelişen kardiyomiyopati tedavisinde değerli katkılar verebilecek bir tedaviye yönelik ajan olabileceği fikrini destekleyecek bulgulara erişilmiştir. Literatüre eklenecek olan bu basamak sayesinde, DKM patofizyolojisinin tedavisi yönünde yeni ve etkili yaklaşımların oluşması adına etkili bir bakış açısı kazandırılacaktır.



**Şekil 6.1.** Çalışmamızda elde ettiğimiz diyabetik kardiyomiyopatide bozulan uyarılma-kasılma çiftlenimi, değişen sinyal yolları ve lokal RAAS elemanları üzerine Ang (1-7)'nin etkilerinin şematik olarak gösterimi.

Sonuçlarımız ACE2/Ang (1-7)/MasR yolağına ve patofizyolojik süreçlerde lokal RAAS etkisine yeni bir bakış açısı sunmaktadır. Bu yaklaşımın daha fazla detayının belirlenmesiyle DKM patofizyolojisine sağladığı olumlu ve olumsuz katkıların kapsamlı olarak anlaşılması sağlanacak ve nihayetinde tedavi yaklaşımı verimli düzeye gelebilecektir. Bahsedilen detaylandırmanın gerçekleştirilmesi için aşağıda maddeler halinde verilen çalışmalar düşünülmektedir;

1) Diyabet gruplarında karşılaştığımız  $I_{NCX}$ 'deki kafeine bağlı olarak gözlemlediğimiz iki ya da üç dalgalı salınımın nedeninin araştırılması ve RYR'nin bu durumla olan ilgisinin açıklanmasıyla birlikte SR  $Ca^{2+}$  içeriğinin tartışma götürmeyecek şekilde belirlenmesi

2) DKM'de lokal ve sistemik açıdan RAAS elemanlarının düzeylerinin karşılaştırılmalı olarak beraber değerlendirilmesi kurulan dengenin nasıl oluştuğunu anlamak için iyi bir yaklaşım olacaktır. Ayrıca Ang (1-7)'nin akut etki dozunun, kanallarda yaptığı değişikliklerin ve DKM durumunda bu etkilerin nasıl farklılaştığının belirlenmesi elektrofizyolojik açıdan ACE2/Ang (1-7)/MasR yolağının işlevinin kapsamlı araştırılması

3) DKM durumunda uzayan AP repolarizasyon süresinin temel nedeni  $I_{to}$ 'dur. Bununla beraber bu koşullarda daha az bilgiye sahip olduğumuz  $Ca^{2+}$  ve ATP bağımlı  $K^+$  kanallarının fonksiyonlarının belirlenmesi ve Ang (1-7)'nin etkisinin değerlendirilmesiyle AP repolarizasyon süresine farklı bir açıdan etkisinin araştırılması

4) DKM'de oksidasyon-redüksiyon dengesinin değişimine bağlı olarak  $K^+$  kanal aktivitelerinde değişim gözlenmektedir. Ang (1-7) uygulamasının bu dengeye ve sistemin elemanlarına nasıl katkı sağlayacağını anlamak

5) DM'den kaynaklı  $Ca^{2+}$  salınımının azalması RYR fonksiyonunun bozulmasından dolayıdır. Ang (1-7)'nin bozulan RYR fonksiyonunu nasıl ve hangi mekanizmaların etkisiyle düzelttiğinin anlaşılması

6) DKM'nin SERCA2a fonksiyonunu bozduğu bilinmekte ve Ang (1-7)'nin bu fonksiyonu düzelttiği gözlenmektedir. Ang (1-7)'nin bu etkisini hangi hücresel mekanizmaların etkisi ile gerçekleştirdiğinin araştırılması

- 7) DKM ile meydana gelen kasılma bozukluğunun nedenleri arasında miyofilament duyarsızlaşması da bulunmaktadır. Ang (1-7)'nin kasılmayı düzeltirken bu duruma da bir etkisinin olup olmadığının anlaşılması
- 8)  $Ca^{2+}$  taşıyıcı ve kasılma makinesi proteinlerinde DM etkisi ile oluşan değişikliklere Ang (1-7) uygulaması etkisinin belirlenmesi
- 9) Ang (1-7)'nin bu etkilerinin MasR dışında olası başka reseptörler üzerinden de gerçekleşip gerçekleşmeyeceğinin araştırılması
- 10) Diyabet oluşumunu takiben DKM oluşmadan önce, bu oluşumu tetikleyen süreçler üzerine Ang (1-7)'nin etkisinin belirlenmesi
- 11) RAAS içerisinde Ang (1-7) ve Ang (1-9) gibi yeni RAAS elemalarının oluşumuna katkı verdiği bilinen ancak detaylı olarak bu sistemdeki işlevleri ve ilişkileri incelenmemiş nötral endopeptidazlar (NEP) ve prolil endopeptidaz (POP)'ların incelenmesiyle lokal RAAS'ın daha detaylı tanımlanması ve etkilerinin belirlenmesi

Bu önerilerimizle birlikte doktora tez çalışmamız sonrasında kazandırdığımız yeni bakış açılarının daha ayrıntılı tanımlanabileceği ve yeni sorular üreterek bu araştırma konusunun ilerlemesinin sağlanması için önemli araştırma alanları sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Acar G, Akcay A, Sokmen A, Ozkaya M, Guler E, Sokmen G, Kaya H, Nacar A B, Tuncer C. Assessment of atrial electromechanical delay, diastolic functions, and left atrial mechanical functions in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Am Soc Echocardiogr.* 2009;**22**(6):732-738.
- Adeghate E. Host-graft circulation and vascular morphology in pancreatic tissue transplants in rats. *Anat Rec.* 1998;**251**(4):448-459.
- Adeghate E, Singh J. Structural changes in the myocardium during diabetes-induced cardiomyopathy. *Heart Fail Rev.* 2014;**19**(1):15-23.
- Andersen, N. H., Poulsen S H, Helleberg K, Ivarsen P, Knudsen S T, Mogensen C E. Impact of essential hypertension and diabetes mellitus on left ventricular systolic and diastolic performance. *Eur J Echocardiogr.* 2003;**4**(4): 306-312.
- Andreozzi, F, Laratta E, Sciacqua A, Perticone F, Sesti G. Angiotensin II impairs the insulin signaling pathway promoting production of nitric oxide by inducing phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser312 and Ser616 in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res.* 2004; **94**(9): 1211-1218.
- Averill D, Ishiyama B Y, Chappell M C, Ferrario C M. Cardiac angiotensin-(1-7) in ischemic cardiomyopathy. *Circulation.* 2003; **108**(17): 2141-2146.
- Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med (Berl).* 2008; **86**(6): 615-621.
- Baker K M, Chernin M I, Schreiber T, Sanghi S, Haiderzaidi S, Booz G W, Dostal D E, Kumar R. Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Regul Pept.* 2004; **120**(1-3): 5-13.
- Bayorh M A, Eatman D, Walton M, Socci R R, Thierry-Palmer M, Emmett N. 1A-779 attenuates angiotensin-(1-7) depressor response in salt-induced hypertensive rats. *Peptides.* 2002; **23**(1): 57-64.

Belke D D, Dillmann W H. Altered cardiac calcium handling in diabetes. *Curr Hypertens Rep.* 2004a; **6**(6): 424-429.

Belke D D, Swanson E A, Dillmann W H. Decreased sarcoplasmic reticulum activity and contractility in diabetic db/db mouse heart. *Diabetes.* 2004b; **53**(12): 3201-3208.

Benter I F, Ferrario C M, Morris M, Diz D I. Antihypertensive actions of angiotensin-(1-7) in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1995; **269**(1 Pt 2): H313-319.

Berry C, Touyz R, Dominiczak A F, Webb R C, Johns D G. Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; **281**(6): H2337-2365.

Bers D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002; **415**(6868): 198-205.

Bidasee K R, Zhang Y, Shao C H, Wang M, Patel K P, Dincer U D, Besch Jr H R. Diabetes increases formation of advanced glycation end products on Sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Diabetes.* 2004; **53**(2): 463-473.

Bindom S M, Hans C P, Xia H, Boulares A H, Lazartigues E. Angiotensin I-converting enzyme type 2 (ACE2) gene therapy improves glycemic control in diabetic mice. *Diabetes.* 2010; **59**(10): 2540-2548.

Bkaily G, Sculptoreanu A, Wang S, Nader M, Hazzouri K M, Jacques D, Regoli D, D'Orleans-Juste P, Avedanian L. Angiotensin II-induced increase of T-type Ca<sup>2+</sup> current and decrease of L-type Ca<sup>2+</sup> current in heart cells. *Peptides.* 2005; **26**(8): 1410-1417.

Boyer J K, Thanigaraj S, Schechtman K B, Perez J E. Prevalence of ventricular diastolic dysfunction in asymptomatic, normotensive patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2004; **93**(7): 870-875.

Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang Y J. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes.* 2002; **51**(6): 1938-1948.

Campagnole-Santos M J, Heringer S B, Batista E N, Khosla M C, Santos R A. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am J Physiol*. 1992; **263**(1 Pt 2): R89-94.

Campbell D J, Kladis A, Duncan A M. Nephrectomy, converting enzyme inhibition, and angiotensin peptides. *Hypertension*. 1993; **22**(4): 513-522.

Canals M, Jenkins L, Kellett E, Milligan G. Up-regulation of the angiotensin II type 1 receptor by the MAS proto-oncogene is due to constitutive activation of Gq/G11 by MAS. *J Biol Chem*. 2006; **281**(24): 16757-16767.

Chappell M C, Pirro N T, Sykes A, Ferrario C M. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*. 1998; **31**(1 Pt 2): 362-367.

Chowdhry M F, Vohra H A, Galinanes M. Diabetes increases apoptosis and necrosis in both ischemic and nonischemic human myocardium: role of caspases and polyadenosine diphosphate-ribose polymerase. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007; **134**(1): 124-131, 131.e121-123.

Cisternas F, Morales M G, Meneses C, Simon F, Brandan E, Abrigo J, Vazquez Y, Cabello-Verrugio C. Angiotensin-(1-7) decreases skeletal muscle atrophy induced by angiotensin II through a Mas receptor-dependent mechanism. *Clin Sci (Lond)*. 2015; **128**(5): 307-319.

Clausmeyer S, Reinecke A, Farrenkopf R, Unger T, Peters J. Tissue-specific expression of a rat renin transcript lacking the coding sequence for the prefragment and its stimulation by myocardial infarction. *Endocrinology*. 2000; **141**(8): 2963-2970.

Coelho M S, Lopes K L, Freitas A, de Oliveira-Sales E B, Bergasmaschi C T, Campos R R, Casarini D E, Carmona A K, Araujo S, Heimann J C, Dolnikoff M S. High sucrose intake in rats is associated with increased ACE2 and angiotensin-(1-7) levels in the adipose tissue. *Regul Pept*. 2010; **162**(1-3): 61-67.

da Silveira K D, Coelho F M, Vieira A T, Sachs D, Barroso L C, Costa V V, Bretas T L, Bader M, de Sousa L P, da Silva T A, dos Santos R A, Simoes e Silva A C, Teixeira M M. Anti-inflammatory effects of the activation of the angiotensin-(1-7)

receptor, MAS, in experimental models of arthritis. *J Immunol.* 2010; **185**(9): 5569-5576.

Dai, D. F., S. C. Johnson, J. J. Villarin, M. T. Chin, M. Nieves-Cintrón, T. Chen, D. J. Marcinek, G. W. Dorn, 2nd, Y. J. Kang, T. A. Prolla, L. F. Santana and P. S. Rabinovitch Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure. *Circ Res.* 2011; **108**(7): 837-846.

Dandona, P., V. Kumar, A. Aljada, H. Ghanim, T. Syed, D. Hofmayer, P. Mohanty, D. Tripathy and R. Garg. Angiotensin II receptor blocker valsartan suppresses reactive oxygen species generation in leukocytes, nuclear factor-kappa B, in mononuclear cells of normal subjects: evidence of an antiinflammatory action. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; **88**(9): 4496-4501.

Danser, A. H., J. J. Saris, M. P. Schuijt and J. P. van Kats. Is there a local renin-angiotensin system in the heart? *Cardiovasc Res.* 1999; **44**(2): 252-265.

Danser, A. H., J. P. van Kats, P. J. Admiraal, F. H. Derkx, J. M. Lamers, P. D. Verdouw, P. R. Saxena and M. A. Schalekamp Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension.* 1994; **24**(1): 37-48.

de Gasparo, M. New basic science initiatives with the angiotensin II receptor blocker valsartan. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2000; **1**(2 Suppl): S3-5.

De Mello, W. C. Renin-angiotensin system and cell communication in the failing heart. *Hypertension.* 1996; **27**(6): 1267-1272.

De Mello, W. C. Influence of alpha-adrenergic-receptor activation on junctional conductance in heart cells: interaction with beta-adrenergic adrenergic agonists. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997a; **29**(2): 273-277.

De Mello, W. C. Cardiac arrhythmias: the possible role of the renin-angiotensin system. *J Mol Med (Berl).* 2001; **79**(2-3): 103-108.

De Mello, W. C. Electrical activity of the heart and angiotensin-converting enzyme inhibitors on the hyperpolarising action of enalapril. *J Hum Hypertens*. 2002; **16 Suppl 1**: S89-92.

De Mello, W. C. Angiotensin (1-7) re-establishes impulse conduction in cardiac muscle during ischaemia-reperfusion. The role of the sodium pump. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2004; **5**(4): 203-208.

De Mello, W. C. Opposite effects of angiotensin II and angiotensin (1-7) on impulse propagation, excitability and cardiac arrhythmias. Is the overexpression of ACE2 arrhythmogenic? *Regul Pept*. 2009; **153**(1-3): 7-10.

De Mello, W. C. Intracellular angiotensin (1-7) increases the inward calcium current in cardiomyocytes. On the role of PKA activation. *Mol Cell Biochem*. 2015; **407**(1-2): 9-16.

De Mello, W. C., R. C. Cherry and S. Manivannan Electrophysiologic and morphologic abnormalities in the failing heart: effect of enalapril on the electrical properties. *J Card Fail*. 1997b; **3**(1): 53-61.

De Mello, W. C. and A. H. Danser Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000; **35**(6): 1183-1188.

de Moura, M. M., R. A. dos Santos, M. J. Campagnole-Santos, M. Todiras, M. Bader, N. Alenina and A. S. Haibara Altered cardiovascular reflexes responses in conscious Angiotensin-(1-7) receptor Mas-knockout mice. *Peptides*. 2010; **31**(10): 1934-1939.

Dhalla, N. S., X. Liu, V. Panagia and N. Takeda Subcellular remodeling and heart dysfunction in chronic diabetes. *Cardiovasc Res*. 1998; **40**(2): 239-247.

Di Zhang, A., A. Nguyen Dinh Cat, C. Soukaseum, B. Escoubet, A. Cherfa, S. Messaoudi, C. Delcayre, J. L. Samuel and F. Jaisser Cross-talk between mineralocorticoid and angiotensin II signaling for cardiac remodeling. *Hypertension*. 2008; **52**(6): 1060-1067.

Diamant, M., H. J. Lamb, J. W. Smit, A. de Roos and R. J. Heine Diabetic cardiomyopathy in uncomplicated type 2 diabetes is associated with the metabolic syndrome and systemic inflammation. *Diabetologia*. 2005; **48**(8): 1669-1670.

Dias-Peixoto, M. F., R. A. Santos, E. R. Gomes, M. N. Alves, P. W. Almeida, L. Greco, M. Rosa, B. Fauler, M. Bader, N. Alenina and S. Guatimosim Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension*. 2008; **52**(3): 542-548.

Domeier, T. L., L. A. Blatter and A. V. Zima Alteration of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release termination by ryanodine receptor sensitization and in heart failure. *J Physiol*. 2009; **587**(Pt 21): 5197-5209.

Domenighetti, A. A., C. Boixel, D. Cefai, H. Abriel and T. Pedrazzini Chronic angiotensin II stimulation in the heart produces an acquired long QT syndrome associated with IK1 potassium current downregulation. *J Mol Cell Cardiol*. 2007; **42**(1): 63-70.

Domenighetti, A. A., Q. Wang, M. Egger, S. M. Richards, T. Pedrazzini and L. M. Delbridge Angiotensin II-mediated phenotypic cardiomyocyte remodeling leads to age-dependent cardiac dysfunction and failure. *Hypertension*. 2005; **46**(2): 426-432.

Dong, B., Q. T. Yu, H. Y. Dai, Y. Y. Gao, Z. L. Zhou, L. Zhang, H. Jiang, F. Gao, S. Y. Li, Y. H. Zhang, H. J. Bian, C. X. Liu, N. Wang, H. Xu, C. M. Pan, H. D. Song, C. Zhang and Y. Zhang Angiotensin-converting enzyme-2 overexpression improves left ventricular remodeling and function in a rat model of diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2012; **59**(8): 739-747.

Dong, B., C. Zhang, J. B. Feng, Y. X. Zhao, S. Y. Li, Y. P. Yang, Q. L. Dong, B. P. Deng, L. Zhu, Q. T. Yu, C. X. Liu, B. Liu, C. M. Pan, H. D. Song, M. X. Zhang and Y. Zhang Overexpression of ACE2 enhances plaque stability in a rabbit model of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; **28**(7): 1270-1276.

Donoghue, M., F. Hsieh, E. Baronas, K. Godbout, M. Gosselin, N. Stagliano, M. Donovan, B. Woolf, K. Robison, R. Jeyaseelan, R. E. Breitbart and S. Acton A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000; **87**(5): E1-9.

Dostal, D. E. and K. M. Baker The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res.* 1999; **85**(7): 643-650.

Dutta, K., M. W. Carmody, S. E. Cala and A. J. Davidoff Depressed PKA activity contributes to impaired SERCA function and is linked to the pathogenesis of glucose-induced cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; **34**(8): 985-996.

Ebermann, L., F. Spillmann, M. Sidiropoulos, F. Escher, S. Heringer-Walther, H. P. Schultheiss, C. Tschope and T. Walther The angiotensin-(1-7) receptor agonist AVE0991 is cardioprotective in diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2008; **590**(1-3): 276-280.

El-Hashim, A. Z., W. M. Renno, R. Raghupathy, H. T. Abduo, S. Akhtar and I. F. Benter Angiotensin-(1-7) inhibits allergic inflammation, via the MAS1 receptor, through suppression of ERK1/2- and NF-kappaB-dependent pathways. *Br J Pharmacol.* 2012; **166**(6): 1964-1976.

Erdos, E. G., F. Tan and R. A. Skidgel Angiotensin I-converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. *Hypertension.* 2010; **55**(2): 214-220.

Farquharson, C. A. and A. D. Struthers Gradual reactivation over time of vascular tissue angiotensin I to angiotensin II conversion during chronic lisinopril therapy in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2002; **39**(5): 767-775.

Ferreira, A. J., C. H. Castro, S. Guatimosim, P. W. Almeida, E. R. Gomes, M. F. Dias-Peixoto, M. N. Alves, C. R. Fagundes-Moura, B. Rentzsch, E. Gava, A. P. Almeida, A. M. Guimaraes, G. T. Kitten, T. Reudelhuber, M. Bader and R. A. Santos Attenuation of isoproterenol-induced cardiac fibrosis in transgenic rats harboring an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein in the heart. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2010; **4**(2): 83-96.

Fomovsky, G. M., S. A. Clark, K. M. Parker, G. Ailawadi and J. W. Holmes Anisotropic reinforcement of acute anteroapical infarcts improves pump function. *Circ Heart Fail.* 2012; **5**(4): 515-522.

Forrester, S. J., K. J. Elliott, T. Kawai, T. Obama, M. J. Boyer, K. J. Preston, Z. Yan, S. Eguchi and V. Rizzo Caveolin-1 Deletion Prevents Hypertensive Vascular Remodeling Induced by Angiotensin II. *Hypertension*. 2017; **69**(1): 79-86.

Frustaci, A., J. Kajstura, C. Chimenti, I. Jakoniuk, A. Leri, A. Maseri, B. Nadal-Ginard and P. Anversa Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res*. 2000; **87**(12): 1123-1132.

Gallego, M., A. Alday, J. Urrutia and O. Casis Transient outward potassium channel regulation in healthy and diabetic hearts. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009; **87**(2): 77-83.

Gallego, M. and O. Casis Regulation of cardiac transient outward potassium current by norepinephrine in normal and diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev*. 2001; **17**(4): 304-309.

Gallinat, S., S. Busche, M. K. Raizada and C. Sumners The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; **278**(3): E357-374.

Gava, E., C. H. de Castro, A. J. Ferreira, H. Colleta, M. B. Melo, N. Alenina, M. Bader, L. A. Oliveira, R. A. Santos and G. T. Kitten Angiotensin-(1-7) receptor Mas is an essential modulator of extracellular matrix protein expression in the heart. *Regul Pept*. 2012; **175**(1-3): 30-42.

Ghosh, A. K. and D. E. Vaughan Fibrosis: is it a coactivator disease? *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012; **4**: 1556-1570.

Giacchetti, G., L. A. Sechi, S. Rilli and R. M. Carey The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. 2005; **16**(3): 120-126.

Giani, J. F., M. A. Mayer, M. C. Munoz, E. A. Silberman, C. Hocht, C. A. Taira, M. M. Gironacci, D. Turyn and F. P. Dominici Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; **296**(2): E262-271.

Golfman, L., I. M. Dixon, N. Takeda, A. Lukas, K. Dakshinamurti and N. S. Dhalla Cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchange and Na(+)-K<sup>+</sup> ATPase activities and gene expression in alloxan-induced diabetes in rats. *Mol Cell Biochem.* 1998; **188**(1-2): 91-101.

Gomes, E. R., A. A. Lara, P. W. Almeida, D. Guimaraes, R. R. Resende, M. J. Campagnole-Santos, M. Bader, R. A. Santos and S. Guatimosim Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. *Hypertension.* 2010; **55**(1): 153-160.

Gomes, E. R., R. A. Santos and S. Guatimosim Angiotensin-(1-7)-mediated signaling in cardiomyocytes. *Int J Hypertens.* 2012; **2012**: 493129.

Graf, K. and U. M. Schaefer-Graf Is Smad3 the key to inflammation and fibrosis in hypertensive heart disease? *Hypertension.* 2010; **55**(5): 1088-1089.

Grobe, J. L., A. P. Mecca, H. Mao and M. J. Katovich Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; **290**(6): H2417-2423.

Grundy, S. M. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; **89**(6): 2595-2600.

Guimaraes, P. S., N. M. Santiago, C. H. Xavier, E. P. Velloso, M. A. Fontes, R. A. Santos and M. J. Campagnole-Santos Chronic infusion of angiotensin-(1-7) into the lateral ventricle of the brain attenuates hypertension in DOCA-salt rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012; **303**(3): H393-400.

Gupte, M., C. M. Boustany-Kari, K. Bharadwaj, S. Police, S. Thatcher, M. C. Gong, V. L. English and L. A. Cassis ACE2 is expressed in mouse adipocytes and regulated by a high-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; **295**(3): R781-788.

Gurley, S. B., A. Allred, T. H. Le, R. Griffiths, L. Mao, N. Philip, T. A. Haystead, M. Donoghue, R. E. Breitbart, S. L. Acton, H. A. Rockman and T. M. Coffman Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. *J Clin Invest.* 2006; **116**(8): 2218-2225.

Gusev, K., A. A. Domenighetti, L. M. Delbridge, T. Pedrazzini, E. Niggli and M. Egger Angiotensin II-mediated adaptive and maladaptive remodeling of cardiomyocyte excitation-contraction coupling. *Circ Res.* 2009; **105**(1): 42-50.

Hao, P. P., Y. G. Chen, Y. P. Liu, M. X. Zhang, J. M. Yang, F. Gao, Y. Zhang and C. Zhang Association of plasma angiotensin-(1-7) level and left ventricular function in patients with type 2 diabetes mellitus. *PLoS One.* 2013; **8**(5): e62788.

Hao, P. P., J. M. Yang, M. X. Zhang, K. Zhang, Y. G. Chen, C. Zhang and Y. Zhang Angiotensin-(1-7) treatment mitigates right ventricular fibrosis as a distinctive feature of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015; **308**(9): H1007-1019.

Harmer, D., M. Gilbert, R. Borman and K. L. Clark Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett.* 2002; **532**(1-2): 107-110.

Hernandez Prada, J. A., A. J. Ferreira, M. J. Katovich, V. Shenoy, Y. Qi, R. A. Santos, R. K. Castellano, A. J. Lampkins, V. Gubala, D. A. Ostrov and M. K. Raizada Structure-based identification of small-molecule angiotensin-converting enzyme 2 activators as novel antihypertensive agents. *Hypertension.* 2008; **51**(5): 1312-1317.

Howarth, F. C., M. A. Qureshi, Z. Hassan, L. T. Al Kury, D. Isaev, K. Parekh, S. R. Yammahi, M. Oz, T. E. Adrian and E. Adeghate Changing pattern of gene expression is associated with ventricular myocyte dysfunction and altered mechanisms of Ca<sup>2+</sup> signalling in young type 2 Zucker diabetic fatty rat heart. *Exp Physiol.* 2011; **96**(3): 325-337.

Hsiao, Y. C., K. Suzuki, H. Abe and T. Toyota Ultrastructural alterations in cardiac muscle of diabetic BB Wistar rats. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1987; **411**(1): 45-52.

Huang, M. H., S. N. Wu, C. P. Chen and A. Y. Shen Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-activated and voltage-dependent K<sup>+</sup> currents by 2-mercaptophenyl-1,4-naphthoquinone in pituitary GH3 cells: contribution to its antiproliferative effect. *Life Sci.* 2002; **70**(10): 1185-1203.

Huang, X. R., A. C. Chung, F. Yang, W. Yue, C. Deng, C. P. Lau, H. F. Tse and H. Y. Lan Smad3 mediates cardiac inflammation and fibrosis in angiotensin II-induced hypertensive cardiac remodeling. *Hypertension*. 2010; **55**(5): 1165-1171.

Huynh, K., H. Kiriazis, X. J. Du, J. E. Love, S. P. Gray, K. A. Jandeleit-Dahm, J. R. McMullen and R. H. Ritchie Targeting the upregulation of reactive oxygen species subsequent to hyperglycemia prevents type 1 diabetic cardiomyopathy in mice. *Free Radic Biol Med*. 2013; **60**: 307-317.

Iijima, K., E. Geshi, A. Nomizo, Y. Arata and T. Katagiri Alterations in sarcoplasmic reticulum and angiotensin II type 1 receptor gene expression after myocardial infarction in rats. *Jpn Circ J*. 1998; **62**(6): 449-454.

Imanaga, I., L. Hai, K. Ogawa, K. Matsumura and T. Mayama Phosphorylation of connexin in functional regulation of the cardiac gap junction. *Exp Clin Cardiol*. 2004; **9**(3): 161-164.

Ishikawa, T., H. Kajiwarra and S. Kurihara Alterations in contractile properties and Ca<sup>2+</sup> handling in streptozotocin-induced diabetic rat myocardium. *Am J Physiol*. 1999; **277**(6): H2185-2194.

Jadhav, A., S. Tiwari, P. Lee and J. F. Ndisang The heme oxygenase system selectively enhances the anti-inflammatory macrophage-M2 phenotype, reduces pericardial adiposity, and ameliorated cardiac injury in diabetic cardiomyopathy in Zucker diabetic fatty rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013; **345**(2): 239-249.

Jaiswal, N., R. K. Jaiswal, E. A. Tallant, D. I. Diz and C. M. Ferrario Alterations in prostaglandin production in spontaneously hypertensive rat smooth muscle cells. *Hypertension*. 1993; **21**(6 Pt 2): 900-905.

Jawien, J., J. Toton-Zuranska, M. Gajda, A. Niepsuj, A. Gebska, K. Kus, M. Suski, G. Pyka-Fosciak, B. Nowak, T. J. Guzik, J. Marcinkiewicz, R. Olszanecki and R. Korbut Angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist ameliorates progress of atherosclerosis in apoE-knockout mice. *J Physiol Pharmacol*. 2012; **63**(1): 77-85.

Jia, G., V. G. DeMarco and J. R. Sowers Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol*. 2016; **12**(3): 144-153.

Kanamori, H., G. Takemura, K. Goto, A. Tsujimoto, A. Mikami, A. Ogino, T. Watanabe, K. Morishita, H. Okada, M. Kawasaki, M. Seishima and S. Minatoguchi Autophagic adaptations in diabetic cardiomyopathy differ between type 1 and type 2 diabetes. *Autophagy*. 2015; **11**(7): 1146-1160.

Kaschina, E. and T. Unger Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press*. 2003; **12**(2): 70-88.

Kasi, V. S., H. D. Xiao, L. L. Shang, S. Iravanian, J. Langberg, E. A. Witham, Z. Jiao, C. J. Gallego, K. E. Bernstein and S. C. Dudley, Jr. Cardiac-restricted angiotensin-converting enzyme overexpression causes conduction defects and connexin dysregulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; **293**(1): H182-192.

Kosmala, W., W. Kucharski, M. Przewlocka-Kosmala and W. Mazurek Comparison of left ventricular function by tissue Doppler imaging in patients with diabetes mellitus without systemic hypertension versus diabetes mellitus with systemic hypertension. *Am J Cardiol*. 2004; **94**(3): 395-399.

Krenning, G., E. M. Zeisberg and R. Kalluri The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol*. 2010; **225**(3): 631-637.

Krop, M. and A. H. Danser Circulating versus tissue renin-angiotensin system: on the origin of (pro)renin. *Curr Hypertens Rep*. 2008; **10**(2): 112-118.

Kudo, H., H. Kai, H. Kajimoto, M. Koga, N. Takayama, T. Mori, A. Ikeda, S. Yasuoka, T. Anegawa, H. Mifune, S. Kato, Y. Hirooka and T. Imaizumi Exaggerated blood pressure variability superimposed on hypertension aggravates cardiac remodeling in rats via angiotensin II system-mediated chronic inflammation. *Hypertension*. 2009; **54**(4): 832-838.

Kumar, R., V. P. Singh and K. M. Baker The intracellular renin-angiotensin system: implications in cardiovascular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008; **17**(2): 168-173.

Kumar, R., V. P. Singh and K. M. Baker The intracellular renin-angiotensin system in the heart. *Curr Hypertens Rep*. 2009; **11**(2): 104-110.

Kumar, R., C. M. Thomas, Q. C. Yong, W. Chen and K. M. Baker The intracrine renin-angiotensin system. *Clin Sci (Lond)*. 2012a; **123**(5): 273-284.

Kumar, R., Q. C. Yong, C. M. Thomas and K. M. Baker Intracardiac intracellular angiotensin system in diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012b; **302**(5): R510-517.

Kurdi, M. and G. W. Booz Focus on mitochondria dysfunction and dysregulation in heart failure: towards new therapeutic strategies to improve heart function. *Congest Heart Fail*. 2011a; **17**(6): 255-256.

Kurdi, M. and G. W. Booz New take on the role of angiotensin II in cardiac hypertrophy and fibrosis. *Hypertension*. 2011b; **57**(6): 1034-1038.

Lacombe, V. A., S. Viatchenko-Karpinski, D. Terentyev, A. Sridhar, S. Emani, J. D. Bonagura, D. S. Feldman, S. Gyorke and C. A. Carnes Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007; **293**(5): R1787-1797.

Lagadic-Gossman, D., K. J. Buckler, K. Le Prigent and D. Feuvray Altered Ca<sup>2+</sup> handling in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *Am J Physiol*. 1996; **270**(5 Pt 2): H1529-1537.

Lee, T. W., Y. H. Kao, T. I. Lee, C. J. Chang, G. S. Lien and Y. J. Chen Calcitriol modulates receptor for advanced glycation end products (RAGE) in diabetic hearts. *Int J Cardiol*. 2014; **173**(2): 236-241.

Lehnart, S. E., L. S. Maier and G. Hasenfuss Abnormalities of calcium metabolism and myocardial contractility depression in the failing heart. *Heart Fail Rev*. 2009; **14**(4): 213-224.

Leung, P. S., W. P. Chan, T. P. Wong and C. Sernia Expression and localization of the renin-angiotensin system in the rat pancreas. *J Endocrinol*. 1999; **160**(1): 13-19.

Li, C. J., L. Lv, H. Li and D. M. Yu Cardiac fibrosis and dysfunction in experimental diabetic cardiomyopathy are ameliorated by alpha-lipoic acid. *Cardiovasc Diabetol*. 2012; **11**: 73.

Li, J., H. Zhu, E. Shen, L. Wan, J. M. Arnold and T. Peng Deficiency of rac1 blocks NADPH oxidase activation, inhibits endoplasmic reticulum stress, and reduces myocardial remodeling in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2010; **59**(8): 2033-2042.

Li, X., Z. Xu, S. Li and G. J. Rozanski Redox regulation of Ito remodeling in diabetic rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; **288**(3): H1417-1424.

Lima, C. V., R. D. Paula, F. L. Resende, M. C. Khosla and R. A. Santos Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin-(1-7) in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 1997; **30**(3 Pt 2): 542-548.

Liu, C., X. H. Lv, H. X. Li, X. Cao, F. Zhang, L. Wang, M. Yu and J. K. Yang Angiotensin-(1-7) suppresses oxidative stress and improves glucose uptake via Mas receptor in adipocytes. *Acta Diabetol*. 2012; **49**(4): 291-299.

Loot, A. E., A. J. Roks, R. H. Henning, R. A. Tio, A. J. Suurmeijer, F. Boomsma and W. H. van Gilst Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation*. 2002; **105**(13): 1548-1550.

Lovren, F., Y. Pan, A. Quan, H. Teoh, G. Wang, P. C. Shukla, K. S. Levitt, G. Y. Oudit, M. Al-Omran, D. J. Stewart, A. S. Slutsky, M. D. Peterson, P. H. Backx, J. M. Penninger and S. Verma Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; **295**(4): H1377-1384.

Lu, Z., Y. P. Jiang, X. H. Xu, L. M. Ballou, I. S. Cohen and R. Z. Lin Decreased L-type Ca<sup>2+</sup> current in cardiac myocytes of type 1 diabetic Akita mice due to reduced phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Diabetes*. 2007; **56**(11): 2780-2789.

Lubel, J. S., C. B. Herath, J. Tchongue, J. Grace, Z. Jia, K. Spencer, D. Casley, P. Crowley, W. Sievert, L. M. Burrell and P. W. Angus Angiotensin-(1-7), an alternative metabolite of the renin-angiotensin system, is up-regulated in human liver disease and has antifibrotic activity in the bile-duct-ligated rat. *Clin Sci (Lond)*. 2009; **117**(11): 375-386.

Lupi, R., M. Bugliani, S. Del Guerra, S. Del Prato, P. Marchetti, U. Boggi, F. Filipponi and F. Mosca Transcription factors of beta-cell differentiation and maturation in isolated human islets: effects of high glucose, high free fatty acids and type 2 diabetes. *Nutr Metab\_Cardiovasc Dis.* 2006; **16**(6): e7-8.

Makino, N., K. S. Dhalla, V. Elimban and N. S. Dhalla Sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> transport in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats. *Am J Physiol.* 1987; **253**(2 Pt 1): E202-207.

Malhotra, A., D. Reich, D. Reich, A. Nakouzi, V. Sanghi, D. L. Geenen and P. M. Buttrick Experimental diabetes is associated with functional activation of protein kinase C epsilon and phosphorylation of troponin I in the heart, which are prevented by angiotensin II receptor blockade. *Circ Res.* 1997; **81**(6): 1027-1033.

Marchesi, C., P. Paradis and E. L. Schiffrin Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 2008; **29**(7): 367-374.

Marcus, Y., G. Shefer, K. Sasson, F. Kohen, R. Limor, O. Pappo, N. Nevo, I. Biton, M. Bach, T. Berkutzki, M. Fridkin, D. Benayahu, Y. Shechter and N. Stern Angiotensin 1-7 as means to prevent the metabolic syndrome: lessons from the fructose-fed rat model. *Diabetes.* 2013; **62**(4): 1121-1130.

Marionneau, C., F. Aimond, S. Brunet, N. Niwa, B. Finck, D. P. Kelly and J. M. Nerbonne PARalpha-mediated remodeling of repolarizing voltage-gated K<sup>+</sup> (Kv) channels in a mouse model of metabolic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2008; **44**(6): 1002-1015.

Mathieu, S., N. El Khoury, K. Rivard, R. Gelinas, P. Goyette, P. Paradis, M. Nemer and C. Fiset Reduction in Na(+) current by angiotensin II is mediated by PKCalpha in mouse and human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte. *Heart Rhythm.* 2016; **13**(6): 1346-1354.

Mazzolai, L., J. Nussberger, J. F. Aubert, D. B. Brunner, G. Gabbiani, H. R. Brunner and T. Pedrazzini Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. *Hypertension.* 1998; **31**(6): 1324-1330.

Miki, T., S. Yuda, H. Kouzu and T. Miura Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features. *Heart Fail Rev.* 2013; **18**(2): 149-166.

Monji, A., T. Mitsui, Y. K. Bando, M. Aoyama, T. Shigeta and T. Murohara Glucagon-like peptide-1 receptor activation reverses cardiac remodeling via normalizing cardiac steatosis and oxidative stress in type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013; **305**(3): H295-304.

Mori, J., V. B. Patel, O. Abo Alrob, R. Basu, T. Altamimi, J. Desaulniers, C. S. Wagg, Z. Kassiri, G. D. Lopaschuk and G. Y. Oudit Angiotensin 1-7 ameliorates diabetic cardiomyopathy and diastolic dysfunction in db/db mice by reducing lipotoxicity and inflammation. *Circ Heart Fail.* 2014; **7**(2): 327-339.

Munoz, M. C., J. F. Giani, V. Burghi, M. A. Mayer, A. Carranza, C. A. Taira and F. P. Dominici The Mas receptor mediates modulation of insulin signaling by angiotensin-(1-7). *Regul Pept.* 2012; **177**(1-3): 1-11.

Munoz, M. C., J. F. Giani and F. P. Dominici Angiotensin-(1-7) stimulates the phosphorylation of Akt in rat extracardiac tissues in vivo via receptor Mas. *Regul Pept.* 2010; **161**(1-3): 1-7.

Muranaka, A., S. Yuda, K. Tsuchihashi, A. Hashimoto, T. Nakata, T. Miura, M. Tsuzuki, C. Wakabayashi, N. Watanabe and K. Shimamoto Quantitative assessment of left ventricular and left atrial functions by strain rate imaging in diabetic patients with and without hypertension. *Echocardiography.* 2009; **26**(3): 262-271.

Murca, T. M., P. L. Moraes, C. A. Capurucó, S. H. Santos, M. B. Melo, R. A. Santos, V. Shenoy, M. J. Katovich, M. K. Raizada and A. J. Ferreira Oral administration of an angiotensin-converting enzyme 2 activator ameliorates diabetes-induced cardiac dysfunction. *Regul Pept.* 2012; **177**(1-3): 107-115.

Nakagaki, T., Y. Hirooka, K. Ito, T. Kishi, S. Hoka and K. Sunagawa Role of angiotensin-(1-7) in rostral ventrolateral medulla in blood pressure regulation via sympathetic nerve activity in Wistar-Kyoto and spontaneous hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 2011; **33**(4): 223-230.

Nicolaou, P. and E. G. Kranias Role of PP1 in the regulation of Ca cycling in cardiac physiology and pathophysiology. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009; **14**: 3571-3585.

Oliveira, M. A., M. H. Carvalho, D. Nigro, C. Passaglia Rde and Z. B. Fortes Angiotensin-(1-7) and bradykinin interaction in diabetes mellitus: in vivo study. *Peptides*. 2002; **23**(8): 1449-1455.

Oudit, G. Y. and J. M. Penninger Recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 as a new renin-angiotensin system peptidase for heart failure therapy. *Curr Heart Fail Rep*. 2011; **8**(3): 176-183.

Papinska, A. M., M. Soto, C. J. Meeks and K. E. Rodgers (2016). Long-term administration of angiotensin (1-7) prevents heart and lung dysfunction in a mouse model of type 2 diabetes (db/db) by reducing oxidative stress, inflammation and pathological remodeling. *Pharmacol Res*. 2016; **107**: 372-380.

Passos-Silva, D. G., T. Verano-Braga and R. A. Santos Angiotensin-(1-7): beyond the cardio-renal actions. *Clin Sci (Lond)*. 2013; **124**(7): 443-456.

Paul, M., A. Poyan Mehr and R. Kreutz Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*. 2006; **86**(3): 747-803.

Paul, M., J. Wagner and V. J. Dzau Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Invest*. 1993; **91**(5): 2058-2064.

Pereira, L., J. Matthes, I. Schuster, H. H. Valdivia, S. Herzig, S. Richard and A. M. Gomez Mechanisms of  $[Ca^{2+}]_i$  transient decrease in cardiomyopathy of db/db type 2 diabetic mice. *Diabetes*. 2006; **55**(3): 608-615.

Pfeffer, M. A. ACE inhibition in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1995; **332**(2): 118-120.

Pfeffer, M. A. and E. D. Frohlich Improvements in clinical outcomes with the use of angiotensin-converting enzyme inhibitors: cross-fertilization between clinical and basic investigation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; **291**(5): H2021-2025.

Pfister, R., R. Cairns, E. Erdmann and C. A. Schneider Prognostic impact of electrocardiographic signs in patients with Type 2 diabetes and cardiovascular disease: results from the PROactive study. *Diabet Med.* 2011; **28**(10): 1206-1212.

Pierce, G. N. and N. S. Dhalla Cardiac myofibrillar ATPase activity in diabetic rats. *J Mol Cell Cardiol.* 1981; **13**(12): 1063-1069.

Pierce, G. N., M. J. Kutryk and N. S. Dhalla Alterations in Ca<sup>2+</sup> binding by and composition of the cardiac sarcolemmal membrane in chronic diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983; **80**(17): 5412-5416.

Poirier, P., P. Bogaty, C. Garneau, L. Marois and J. 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**(1): 5-10.

Putnam, K., R. Shoemaker, F. Yiannikouris and L. A. Cassis The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* .2012;**302**(6): H1219-1230.

Qi, Y., V. Shenoy, F. Wong, H. Li, A. Afzal, J. Mocco, C. Sumners, M. K. Raizada and M. J. Katovich Lentivirus-mediated overexpression of angiotensin-(1-7) attenuated ischaemia-induced cardiac pathophysiology. *Exp Physiol.* 2011; **96**(9): 863-874.

Qin, D., B. Huang, L. Deng, H. El-Adawi, K. Ganguly, J. R. Sowers and N. El-Sherif Downregulation of K(+) channel genes expression in type I diabetic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; **283**(3): 549-553

Radovits T, Korkmaz S, Loganathan S, Barnucz E, Bömicke T, Arif R, Karck M, Szabo G. Comparative investigation of the left ventricular-volume relationship in rat models of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297:125-133

Raimondi, L., P. De Paoli, E. Mannucci, G. Lonardo, L. Sartiani, G. Banchelli, R. Pirisino, A. Mugelli and E. Cerbai Restoration of cardiomyocyte functional

properties by angiotensin II receptor blockade in diabetic rats. *Diabetes*. 2004; **53**(7): 1927-1933.

Rajesh, M., S. Batkai, M. Kechrid, P. Mukhopadhyay, W. S. Lee, B. Horvath, E. Holovac, R. Cinar, L. Liaudet, K. Mackie, G. Hasko and P. Pacher Cannabinoid 1 receptor promotes cardiac dysfunction, oxidative stress, inflammation, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*. 2012; **61**(3): 716-727.

Reaven, G. M., H. Chang and B. B. Hoffman Additive hypoglycemic effects of drugs that modify free-fatty acid metabolism by different mechanisms in rats with streptozocin-induced diabetes. *Diabetes*. 1988; **37**(1): 28-32.

Regan, T. J., C. F. Wu, C. K. Yeh, H. A. Oldewurtel and B. Haider Myocardial composition and function in diabetes. The effects of chronic insulin use. *Circ Res*. 1981; **49**(6): 1268-1277.

Reiken, S., M. Gaburjakova, S. Guatimosim, A. M. Gomez, J. D'Armiento, D. Burkhoff, J. Wang, G. Vassort, W. J. Lederer and A. R. Marks Protein kinase A phosphorylation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) in normal and failing hearts. Role of phosphatases and response to isoproterenol. *J Biol Chem*. 2003; **278**(1): 444-453.

Rentzsch, B., M. Todiras, R. Iliescu, E. Popova, L. A. Campos, M. L. Oliveira, O. C. Baltatu, R. A. Santos and M. Bader Transgenic angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in vessels of SHRSP rats reduces blood pressure and improves endothelial function. *Hypertension*. 2008; **52**(5): 967-973.

Reudelhuber, T. L., K. E. Bernstein and P. Delafontaine Is angiotensin II a direct mediator of left ventricular hypertrophy? Time for another look. *Hypertension*. 2007; **49**(6): 1196-1201.

Ribeiro-Oliveira, A., Jr., A. I. Nogueira, R. M. Pereira, W. W. Boas, R. A. Dos Santos and A. C. Simoes e Silva The renin-angiotensin system and diabetes: an update. *Vasc Health Risk Manag*. 2008; **4**(4): 787-803.

Rice, G. I., D. A. Thomas, P. J. Grant, A. J. Turner and N. M. Hooper Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J.* 2004; **383**(Pt 1): 45-51.

Riera, M., E. Marquez, S. Clotet, J. Gimeno, H. Roca-Ho, J. Lloreta, N. Juanpere, D. Batlle, J. Pascual and M. J. Soler Effect of insulin on ACE2 activity and kidney function in the non-obese diabetic mouse. *PLoS One.* 2014; **9**(1): e84683.

Rong, X., Y. Li, K. Ebihara, M. Zhao, J. Naowaboot, T. Kusakabe, K. Kuwahara, M. Murray and K. Nakao Angiotensin II type 1 receptor-independent beneficial effects of telmisartan on dietary-induced obesity, insulin resistance and fatty liver in mice. *Diabetologia.* 2010; **53**(8): 1727-1731.

Rowe, B. P., D. L. Saylor, R. C. Speth and D. R. Absher Angiotensin-(1-7) binding at angiotensin II receptors in the rat brain. *Regul Pept.* 1995; **56**(2-3): 139-146.

Rozanski, G. J. and Z. Xu A metabolic mechanism for cardiac K<sup>+</sup> channel remodelling. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002; **29**(1-2): 132-137.

Rozanski, G. J., Z. Xu, K. Zhang and K. P. Patel Altered K<sup>+</sup> current of ventricular myocytes in rats with chronic myocardial infarction. *Am J Physiol.* 1998; **274**(1): H259-265.

Rubler, S., J. Dlugash, Y. Z. Yuceoglu, T. Kumral, A. W. Branwood and A. Grishman New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol.* 1972; **30**(6): 595-602.

Ruiz-Ortega, M., V. Esteban, M. Ruperez, E. Sanchez-Lopez, J. Rodriguez-Vita, G. Carvajal and J. Egido Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006; **15**(2): 159-166.

Ruiz-Ortega, M., M. Ruperez, O. Lorenzo, V. Esteban, J. Blanco, S. Mezzano and J. Egido Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int Suppl.* 2002;(82): S12-22.

Sah, R., G. Y. Oudit, T. T. Nguyen, H. W. Lim, A. D. Wickenden, G. J. Wilson, J. D. Molkentin and P. H. Backx Inhibition of calcineurin and sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> influx

protects cardiac morphology and ventricular function in K(v)4.2N transgenic mice. *Circulation*. 2002; **105**(15): 1850-1856.

Sampaio, W. O., A. A. Nascimento and R. A. Santos Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; **284**(6): H1985-1994.

Sampaio, W. O., R. A. Souza dos Santos, R. Faria-Silva, L. T. da Mata Machado, E. L. Schiffrin and R. M. Touyz Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*. 2007; **49**(1): 185-192.

Santos, R. A., C. H. Castro, E. Gava, S. V. Pinheiro, A. P. Almeida, R. D. Paula, J. S. Cruz, A. S. Ramos, K. T. Rosa, M. C. Irigoyen, M. Bader, N. Alenina, G. T. Kitten and A. J. Ferreira Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension*. 2006; **47**(5): 996-1002.

Santos, R. A., A. J. Ferreira, A. P. Nadu, A. N. Braga, A. P. de Almeida, M. J. Campagnole-Santos, O. Baltatu, R. Iliescu, T. L. Reudelhuber and M. Bader Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics*. 2004; **17**(3): 292-299.

Santos, R. A., A. C. Simoes e Silva, C. Maric, D. M. Silva, R. P. Machado, I. de Buhr, S. Heringer-Walther, S. V. Pinheiro, M. T. Lopes, M. Bader, E. P. Mendes, V. S. Lemos, M. J. Campagnole-Santos, H. P. Schultheiss, R. Speth and T. Walther Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; **100**(14): 8258-8263.

Santos, S. H., J. F. Braga, E. G. Mario, L. C. Porto, G. Rodrigues-Machado Mda, A. Murari, L. M. Botion, N. Alenina, M. Bader and R. A. Santos Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1-7). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; **30**(5): 953-961.

Santos, S. H., J. F. Giani, V. Burghi, J. G. Miquet, F. Qadri, J. F. Braga, M. Todiras, K. Kotnik, N. Alenina, F. P. Dominici, R. A. Santos and M. Bader Oral administration of angiotensin-(1-7) ameliorates type 2 diabetes in rats. *J Mol Med (Berl)*. 2014; **92**(3): 255-265.

Schannwell, C. M., M. Schneppenheim, S. Perings, G. Plehn and B. E. Strauer Left ventricular diastolic dysfunction as an early manifestation of diabetic cardiomyopathy. *Cardiology*. 2002; **98**(1-2): 33-39.

Schling, P., H. Mallow, A. Trindl and G. Loffler Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998; **23**(4): 336-341.

Schwarz, E. R., H. Montino, J. Fleischhauer, H. G. Klues, J. vom Dahl and P. Hanrath Angiotensin II receptor antagonist EXP 3174 reduces infarct size comparable with enalaprilat and augments preconditioning in the pig heart. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1997; **11**(5): 687-695.

Serner, G. G., M. Boddi, I. Cecioni, S. Vanni, M. Coppo, M. L. Papa, B. Bandinelli, I. Bertolozzi, G. Polidori, T. Toscano, M. Maccherini and P. A. Modesti Cardiac angiotensin II formation in the clinical course of heart failure and its relationship with left ventricular function. *Circ Res*. 2001; **88**(9): 961-968.

Severs, N. J. Gap junction alterations in the failing heart. *Eur Heart J*. 1994; **15 Suppl D**: 53-57.

Shah, A., Y. B. Oh, S. H. Lee, J. M. Lim and S. H. Kim Angiotensin-(1-7) attenuates hypertension in exercise-trained renal hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012; **302**(11): H2372-2380.

Shenoy, V., A. J. Ferreira, Y. Qi, R. A. Fraga-Silva, C. Diez-Freire, A. Dooies, J. Y. Jun, S. Sriramula, N. Mariappan, D. Pourang, C. S. Venugopal, J. Francis, T. Reudelhuber, R. A. Santos, J. M. Patel, M. K. Raizada and M. J. Katovich The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; **182**(8): 1065-1072.

Shimoni, Y., D. Hunt, M. Chuang, K. Y. Chen, G. Kargacin and D. L. Severson Modulation of potassium currents by angiotensin and oxidative stress in cardiac cells from the diabetic rat. *J Physiol*. 2005; **567**(Pt 1): 177-190.

Shivakumar, K., D. E. Dostal, K. Boheler, K. M. Baker and E. G. Lakatta Differential response of cardiac fibroblasts from young adult and senescent rats to ANG II."Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003; **284**(4): H1454-1459.

Shivalkar, B., D. Dhondt, I. Goovaerts, L. Van Gaal, J. Bartunek, P. Van Crombrugge and C. Vrints Flow mediated dilatation and cardiac function in type 1 diabetes mellitus."Am J Cardiol. 2006; **97**(1): 77-82.

Sica, D. A. and A. Ichihara The Renin Report. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2006; **7**(4): 247-251.

Sifi, A., S. Adi-Bessalem and F. Laraba-Djebari Role of angiotensin II and angiotensin type-1 receptor in scorpion venom-induced cardiac and aortic tissue inflammation. Exp Mol Pathol. 2017; **102**(1): 32-40.

Singh, K., T. Singh and P. L. Sharma Beneficial effects of angiotensin (1-7) in diabetic rats with cardiomyopathy. Ther Adv Cardiovasc Dis.2011; **5**(3): 159-167.

Singh, T., K. Singh and P. L. Sharma Ameliorative potential of angiotensin1-7/Mas receptor axis in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2010; **32**(1): 19-25.

Singh, V. P., K. M. Baker and R. Kumar Activation of the intracellular renin-angiotensin system in cardiac fibroblasts by high glucose: role in extracellular matrix production. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008a; **294**(4): H1675-1684.

Singh, V. P., B. Le, V. B. Bhat, K. M. Baker and R. Kumar High-glucose-induced regulation of intracellular ANG II synthesis and nuclear redistribution in cardiac myocytes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007; **293**(2): H939-948.

Singh, V. P., B. Le, R. Khode, K. M. Baker and R. Kumar Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. Diabetes. 2008b; **57**(12): 3297-3306.

Somanna, N. K., A. J. Valente, M. Krenz, K. S. McDonald, Y. Higashi, M. Noda and B. Chandrasekar Histone deacetyltransferase inhibitors Trichostatin A and Mocetinostat differentially regulate MMP9, IL-18 and RECK expression, and

attenuate Angiotensin II-induced cardiac fibroblast migration and proliferation. *Hypertens Res.* 2016; **39**(10): 709-716.

Sorrentino, A., G. Borghetti, Y. Zhou, A. Cannata, M. Meo, S. Signore, P. Anversa, A. Leri, P. Goichberg and K. Qanud Hyperglycemia induces defective Ca<sup>2+</sup> homeostasis in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017;**312**(1): H150-h161.

Souza, L. L. and C. M. Costa-Neto Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages. *J Cell Physiol.* 2012; **227**(5): 2117-2122.

Sowers, J. R. Recommendations for special populations: diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *Am J Hypertens.* 2003; **16**(11 Pt 2): 41s-45s.

Su, Z., J. Zimpelmann and K. D. Burns Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2006; **69**(12): 2212-2218.

Sugden, M. C. and M. J. Holness Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Arch Physiol Biochem.* 2006; **112**(3): 139-149.

Takeda, M., K. Yamamoto, Y. Takemura, H. Takeshita, K. Hongyo, T. Kawai, H. Hanasaki-Yamamoto, R. Oguro, Y. Takami, Y. Tatara, Y. Takeya, K. Sugimoto, K. Kamide, M. Ohishi and H. Rakugi Loss of ACE2 exaggerates high-calorie diet-induced insulin resistance by reduction of GLUT4 in mice. *Diabetes.* 2013; **62**(1): 223-233.

Takeda, N., I. M. Dixon, T. Hata, V. Elimban, K. R. Shah and N. S. Dhalla Sequence of alterations in subcellular organelles during the development of heart dysfunction in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 1996; **30 Suppl**: 113-122.

Than, A., M. K. Leow and P. Chen (2013). Control of adipogenesis by the autocrine interplays between angiotensin 1-7/Mas receptor and angiotensin II/AT1 receptor signaling pathways. *J Biol Chem.* 2013; **288**(22): 15520-15531.

Tipnis, S. R., N. M. Hooper, R. Hyde, E. Karran, G. Christie and A. J. Turner A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2000; **275**(43): 33238-33243.

Tirupula, K. C., R. Desnoyer, R. C. Speth and S. S. Karnik Atypical signaling and functional desensitization response of MAS receptor to peptide ligands. *PLoS One.* 2014; **9**(7): e103520.

Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 2000; **52**(4): 639-672.

Tozakidou, M., D. Goltz, T. Hagenstrom, M. K. Budack, H. Vitzthum, K. Szlachta, R. Bahring and H. Ehmke Molecular and functional remodeling of I(to) by angiotensin II in the mouse left ventricle. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; **48**(1): 140-151.

Turnbull, F., B. Neal, C. Algert, J. Chalmers, N. Chapman, J. Cutler, M. Woodward and S. MacMahon Effects of different blood pressure-lowering regimens on major cardiovascular events in individuals with and without diabetes mellitus: results of prospectively designed overviews of randomized trials. *Arch Intern Med.* 2005; **165**(12): 1410-1419.

Uhal, B. D., X. Li, A. Xue, X. Gao and A. Abdul-Hafez Regulation of alveolar epithelial cell survival by the ACE-2/angiotensin 1-7/Mas axis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011; **301**(3): L269-274.

Underwood, P. C. and G. K. Adler The renin angiotensin aldosterone system and insulin resistance in humans. *Curr Hypertens Rep.* 2013; **15**(1): 59-70.

Valensi, P. E., N. B. Johnson, P. Maison-Blanche, F. Extramania, G. Motte and P. Coumel Influence of cardiac autonomic neuropathy on heart rate dependence of ventricular repolarization in diabetic patients. *Diabetes Care.* 2002; **25**(5): 918-923.

van Kats, J. P., A. H. Danser, J. R. van Meegen, L. M. Sassen, P. D. Verdouw and M. A. Schalekamp Angiotensin production by the heart: a quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusions. *Circulation.* 1998; **98**(1): 73-81.

Varagic, J., S. Ahmad, K. B. Brosnihan, L. Groban, M. C. Chappell, E. A. Tallant, P. E. Gallagher and C. M. Ferrario Decreased cardiac Ang-(1-7) is associated with salt-induced cardiac remodeling and dysfunction. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2010; **4**(1): 17-25.

Verano-Braga, T., V. Schwammle, M. Sylvester, D. G. Passos-Silva, A. A. Peluso, G. M. Etelvino, R. A. Santos and P. Roepstorff Time-resolved quantitative phosphoproteomics: new insights into Angiotensin-(1-7) signaling networks in human endothelial cells. *J Proteome Res.* 2012; **11**(6): 3370-3381.

Vickers, C., P. Hales, V. Kaushik, L. Dick, J. Gavin, J. Tang, K. Godbout, T. Parsons, E. Baronas, F. Hsieh, S. Acton, M. Patane, A. Nichols and P. Tummino Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2002; **277**(17): 14838-14843.

Vilas-Boas, W. W., A. Ribeiro-Oliveira, Jr., R. M. Pereira, C. Ribeiro Rda, J. Almeida, A. P. Nadu, A. C. Simoes e Silva and R. A. dos Santos (2009). Relationship between angiotensin-(1-7) and angiotensin II correlates with hemodynamic changes in human liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2009; **15**(20): 2512-2519.

Wang, B., M. E. Tedder, C. E. Perez, G. Wang, A. L. de Jongh Curry, F. To, S. H. Elder, L. N. Williams, D. T. Simionescu and J. Liao tructural and biomechanical characterizations of porcine myocardial extracellular matrix. *J Mater Sci Mater Med.* 2012; **23**(8): 1835-1847.

Wang, D. W., T. Kiyosue, S. Shigematsu and M. Arita Abnormalities of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in ventricular myocytes from rats with chronic diabetes. *Am J Physiol.* 1995; **269**(4 Pt 2): H1288-1296.

Wang, K., X. Hu, C. Du, S. Tu, F. Zhang and X. Xie Angiotensin-(1-7) suppresses the number and function of the circulating fibrocytes by upregulating endothelial nitric oxide synthase expression. *Mol Cell Biochem.* 2012; **365**(1-2): 19-27.

Wang, L., D. Luo, X. Liao, J. He, C. Liu, C. Yang and H. Ma Ang-(1-7) offers cytoprotection against ischemia-reperfusion injury by restoring intracellular calcium homeostasis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014; **63**(3): 259-264.

Wang, X. and G. Li Angiotensin-(1-7) prevent atrial tachycardia induced sodium channel remodeling. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2014; **37**(10): 1349-1356.

Weber, K. T., Y. Sun, S. K. Bhattacharya, R. A. Ahokas and I. C. Gerling Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat Rev Cardiol.* 2013; **10**(1): 15-26.

Weber, M. A. and T. D. Giles Inhibiting the renin-angiotensin system to prevent cardiovascular diseases: do we need a more comprehensive strategy? *Rev Cardiovasc Med.* 2006; **7**(2): 45-54.

Weber, S., S. Meyer-Roxlau, M. Wagner, D. Dobrev and A. El-Armouche Counteracting Protein Kinase Activity in the Heart: The Multiple Roles of Protein Phosphatases. *Front Pharmacol.* 2015; **6**: 270.

Welch, W. J. Angiotensin II-dependent superoxide: effects on hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension.* 2008; **52**(1): 51-56.

Westermann, D., S. Rutschow, S. Jager, A. Linderer, S. Anker, A. Riad, T. Unger, H. P. Schultheiss, M. Pauschinger and C. Tschope Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism. *Diabetes.* 2007a; **56**(3): 641-646.

Westermann, D., S. Rutschow, S. Van Linthout, A. Linderer, C. Bucker-Gartner, M. Sobirey, A. Riad, M. Pauschinger, H. P. Schultheiss and C. Tschope Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates left ventricular dysfunction by mediating pro-inflammatory cardiac cytokine levels in a mouse model of diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2006; **49**(10): 2507-2513.

Westermann, D., S. Van Linthout, S. Dhayat, N. Dhayat, A. Schmidt, M. Noutsias, X. Y. Song, F. Spillmann, A. Riad, H. P. Schultheiss and C. Tschope Tumor necrosis factor-alpha antagonism protects from myocardial inflammation and fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2007b; **102**(6): 500-507.

Westermeyer, F., J. A. Riquelme, M. Pavez, V. Garrido, A. Diaz, H. E. Verdejo, P. F. Castro, L. Garcia and S. Lavandero New Molecular Insights of Insulin in Diabetic Cardiomyopathy. *Front Physiol.* 2016; **7**: 125.

Whitsel, E. A., E. J. Boyko, P. M. Rautaharju, T. E. Raghunathan, D. Lin, R. M. Pearce, S. A. Weinmann and D. S. Siscovick Electrocardiographic QT interval prolongation and risk of primary cardiac arrest in diabetic patients. *Diabetes Care.* 2005; **28**(8): 2045-2047.

Wosten-van Asperen, R. M., R. Lutter, P. A. Specht, G. N. Moll, J. B. van Woensel, C. M. van der Loos, H. van Goor, J. Kamilic, S. Florquin and A. P. Bos Acute respiratory distress syndrome leads to reduced ratio of ACE/ACE2 activities and is prevented by angiotensin-(1-7) or an angiotensin II receptor antagonist. *J Pathol.* 2011; **225**(4): 618-627.

Wysocki, J., M. Ye, E. Rodriguez, F. R. Gonzalez-Pacheco, C. Barrios, K. Evora, M. Schuster, H. Loibner, K. B. Brosnihan, C. M. Ferrario, J. M. Penninger and D. Batlle Targeting the degradation of angiotensin II with recombinant angiotensin-converting enzyme 2: prevention of angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension.* 2010; **55**(1): 90-98.

Xu, P., A. C. Costa-Goncalves, M. Todiras, L. A. Rabelo, W. O. Sampaio, M. M. Moura, S. S. Santos, F. C. Luft, M. Bader, V. Gross, N. Alenina and R. A. Santos Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. *Hypertension.* 2008; **51**(2): 574-580.

Xu, Z., K. P. Patel, M. F. Lou and G. J. Rozanski Up-regulation of K(+) channels in diabetic rat ventricular myocytes by insulin and glutathione. *Cardiovasc Res.* 2002; **53**(1): 80-88.

Xu, Z., K. P. Patel and G. J. Rozanski Metabolic basis of decreased transient outward K<sup>+</sup> current in ventricular myocytes from diabetic rats. *Am J Physiol.* 1996; **271**(5 Pt 2): H2190-2196.

Yaffe, M. P. and G. Schatz Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984; **81**(15): 4819-4823.

Yamaleyeva, L. M., S. Gilliam-Davis, I. Almeida, K. B. Brosnihan, S. H. Lindsey and M. C. Chappell Differential regulation of circulating and renal ACE2 and ACE in hypertensive mRen2.Lewis rats with early-onset diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012; **302**(11): F1374-1384.

Yamazato, M., Y. Yamazato, C. Sun, C. Diez-Freire and M. K. Raizada Overexpression of angiotensin-converting enzyme 2 in the rostral ventrolateral medulla causes long-term decrease in blood pressure in the spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2007; **49**(4): 926-931.

Yaras, N., A. Bilginoglu, G. Vassort and B. Turan (2007). "Restoration of diabetes-induced abnormal local  $\text{Ca}^{2+}$  release in cardiomyocytes by angiotensin II receptor blockade." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; **292**(2): H912-920.

Yaras, N., M. Ugur, S. Ozdemir, H. Gurdal, N. Purali, A. Lacampagne, G. Vassort and B. Turan Effects of diabetes on ryanodine receptor Ca release channel (RyR2) and  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in rat heart. *Diabetes*. 2005; **54**(11): 3082-3088.

Ye, M., J. Wysocki, F. R. Gonzalez-Pacheco, M. Salem, K. Evora, L. Garcia-Halpin, M. Poglitsch, M. Schuster and D. Batlle Murine recombinant angiotensin-converting enzyme 2: effect on angiotensin II-dependent hypertension and distinctive angiotensin-converting enzyme 2 inhibitor characteristics on rodent and human angiotensin-converting enzyme 2. *Hypertension*. 2012; **60**(3): 730-740.

Yong, Q. C., C. M. Thomas, R. Seqqat, N. Chandel, K. M. Baker and R. Kumar Angiotensin type 1a receptor-deficient mice develop diabetes-induced cardiac dysfunction, which is prevented by renin-angiotensin system inhibitors. *Cardiovasc Diabetol*. 2013; **12**: 169.

Yousif, M. H., G. S. Dhaunsi, B. M. Makki, B. A. Qabazard, S. Akhtar and I. F. Benter Characterization of Angiotensin-(1-7) effects on the cardiovascular system in an experimental model of type-1 diabetes. *Pharmacol Res*. 2012; **66**(3): 269-275.

Yu, H., X. Li, G. S. Marchetto, R. Dy, D. Hunter, B. Calvo, T. L. Dawson, M. Wilm, R. J. Andereg, L. M. Graves and H. S. Earp Activation of a novel calcium-dependent protein-tyrosine kinase. Correlation with c-Jun N-terminal kinase but not

mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem.* 1996; **271**(47): 29993-29998.

Yusuf, S., B. Pitt, C. E. Davis, W. B. Hood and J. N. Cohn Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med.* 1991; **325**(5): 293-302.

Zabalgoitia, M., M. F. Ismaeil, L. Anderson and F. A. Maklady Prevalence of diastolic dysfunction in normotensive, asymptomatic patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2001; **87**(3): 320-323.

Zhang, F., Y. Hu, Q. Xu and S. Ye Different effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *PLoS One.* 2010; **5**(8): e12323.

Zhang, L., M. B. Cannell, A. R. Phillips, G. J. Cooper and M. L. Ward Altered calcium homeostasis does not explain the contractile deficit of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes.* 2008; **57**(8): 2158-2166.

Zhang, R., Y. Y. Zhang, X. R. Huang, Y. Wu, A. C. Chung, E. X. Wu, A. J. Szalai, B. C. Wong, C. P. Lau and H. Y. Lan C-reactive protein promotes cardiac fibrosis and inflammation in angiotensin II-induced hypertensive cardiac disease. *Hypertension.* 2010; **55**(4): 953-960.

Zhao, J., E. Liu, G. Li, L. Qi, J. Li and W. Yang Effects of the angiotensin-(1-7)/Mas/PI3K/Akt/nitric oxide axis and the possible role of atrial natriuretic peptide in an acute atrial tachycardia canine model. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2015; **16**(4): 1069-1077.

Zhao, T., W. Zhao, Y. Chen, V. S. Li, W. Meng and Y. Sun Platelet-derived growth factor-D promotes fibrogenesis of cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013; **304**(12): H1719-1726.

Zhao, Z., N. Fefelova, M. Shanmugam, P. Bishara, G. J. Babu and L. H. Xie Angiotensin II induces afterdepolarizations via reactive oxygen species and calmodulin kinase II signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2011; **50**(1): 128-136.

Zhong, J., R. Basu, D. Guo, F. L. Chow, S. Byrns, M. Schuster, H. Loibner, X. H. Wang, J. M. Penninger, Z. Kassiri and G. Y. Oudit Angiotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction. *Circulation*. 2010; **122**(7): 717-728, 718 p following 728.

Zhou, G., X. Li, D. W. Hein, X. Xiang, J. P. Marshall, S. D. Prabhu and L. Cai. Metallothionein suppresses angiotensin II-induced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation, nitrosative stress, apoptosis, and pathological remodeling in the diabetic heart. *J Am Coll Cardiol*. 2008; **52**(8): 655-666.

Zhou, P., C. P. Cheng, T. Li, C. M. Ferrario and H. J. Cheng. Modulation of cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current by angiotensin-(1-7): normal versus heart failure. *Ther Adv Cardiovasc*. 2015; Dis **9**(6): 342-353.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

|                     |            |                |                         |
|---------------------|------------|----------------|-------------------------|
| <b>Adı</b>          | Uğur       | <b>Uyruğu</b>  | T.C.                    |
| <b>Soyadı</b>       | Dalaman    | <b>Tel no</b>  | 0532 638 33 73          |
| <b>Doğum tarihi</b> | 05.08.1984 | <b>e-posta</b> | ugurdalaman@hotmail.com |

### Eğitim Bilgileri

|               | <b>Mezun olduğu kurum</b>                                  | <b>Mezuniyet yılı</b> |
|---------------|------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Lise          | Hacı Malike Mehmet Bileydi Anadolu Lisesi                  | 2002                  |
| Lisans        | Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü         | 2009                  |
| Yüksek Lisans | Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı | 2014                  |
| Doktora       | Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı | 2020                  |

### İş Deneyimi

| <b>Görevi</b>          | <b>Kurum</b>                       | <b>Süre</b>  |
|------------------------|------------------------------------|--------------|
| Araş. Gör.             | Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi | 2013-2020    |
| <b>Yabancı Dilleri</b> | <b>Sınav türü</b>                  | <b>Puanı</b> |
| İngilizce              | Yabancı Dil Sınavı (YDS)           | 75.00        |

### Proje Deneyimi

| <b>Proje Adı</b>                                                                                                              | <b>Destekleyen kurum</b>                                                    | <b>Süre</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-------------|
| İzoproterenol ile Oluşturulan Kardiyak Hasara Kükürt Dioksitin Etkisinin Elektrofizyolojik Parametrelerle İncelenmesi         | Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) | 2012-2014   |
| Diyabetik Kardiyomiyopatide Anjiyotensin 1-7 Sinyalinin Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi Üzerine Etkileri ve Mekanizması           | Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) | 2017-2020   |
| Deneyisel Diyabetik Kardiyomiyopatide Bozulan Uyarılma-Kasılma Süreçleri Üzerine ACE2/ Ang1-7 Aksının Etkilerinin İncelenmesi | Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)                   | 2017-2020   |

**Burslar-Ödüller:**

- 1) Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK); 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı; Bursiyer

**Yayınlar ve Bildiriler:**

- 1) Mathematical Model of The Ventricular Action Potential and Effects of Isoproterenol-Induced Cardiac Hypertrophy in Rats. European Biophysics Journal. 2020; Uluslararası Makale (DOI: 10.1007/s00249-020-01439-8).
- 2) Araşidonik Asit Metaboliti 20-HETE'nin Kardiyak Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi Üzerine Akut Etkisi; Fırat Üniveristesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi. 2020; Ulusal Makale (Kabul edilmiştir, Yayın aşamasında).
- 3) Effect of Angiotenin 1-7 Treatment on Oxidative Stress Parameters, IMA and MPO Levels in Diabetes; 29th International Biochemistry Congress, 2018; Sözlü Sunum
- 4) Diyabetik Kardiyomiyopati Üzerine Anjiyotensin 1-7'nin Etkilerinin İncelenmesi; 31. Ulusal Biyofizik Kongresi, 2019; Sözlü Sunum
- 5) Taurine İnkübasyonu Deneysel Diyabetik Kardiyomiyopatide Uzayan Aksiyon Potansiyelini Kısaltır; 31. Ulusal Biyofizik Kongresi, 2019; Poster Sunumu
- 6) Yaşlılığa Bağlı Ventriküler Aksiyon Potansiyeli Değişimleri Üzerine Ranolazinin Etkisi; 28-29. Ulusal Biyofizik Kongresi, 2017; Poster Sunumu
- 7) Araşidonik Asit Metaboliti 20-HETE'nin Kardiyomiyosit Üzerine Elektrofizyolojik Etkileri; 28-29. Ulusal Biyofizik Kongresi, 2017; Poster Sunumu
- 8) Diyabetik Kardiyomiyopatide Uzamış Aksiyon Potansiyeline Yeni Bir Yaklaşım: Geç Sodyum Akımları ( $I_{NaL}$ ); 27. Ulusal Biyofizik Kongresi, 2015; Poster Sunumu

- 9) Kalp Yetmezliğinde Aksiyon Potansiyelinin Uzamasına Katkı Sağlayan Geç Sodyum Akımlarına Bir Gazotransmitter Olan  $\text{SO}_2$ 'nin Etkisi; 27. Ulusal Biyofizik Kongresi, 2015; Poster Sunumu
- 10) Late Sodium Current Contribute Action Potential Prolongation in Isoproterenol Induced Cardiomyopathy; 10th EBSA European Biophysics Congress, 2015; Poster Sunumu
- 11) Sulfur Dioxide Derivative Prevents Left Ventricular Hypertrophy and Electrophysiological Alterations; Experimental Biology 2015; Poster Sunumu
- 12) Beta-Adrenerjik Stimülasyonun Aort Kasılma ve Gevşeme Yanıtlarına Etkisi; 39. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 2014; Poster Sunumu
- 13) Sulfur Dioxide Derivative Prevents Isoproterenol Induced Electrophysiological Alterations; Frontiers in Cardiovascular Biology, 2014; Poster Sunumu
- 14) Kükürt Dioksit ( $\text{SO}_2$ ) Türevinin Kardiyomiyositlerde Adrenerjik Uyarımla Oluşturulan Elektrofizyolojik Değişikler Üzerine Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi; 25. Ulusal Biyofizik Kongresi, 2013; Poster Sunumu