

158679

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANJİYOTENSİN II RESEPTÖRÜNÜN DENEYSEL  
DİYABETİK SIÇAN KALBI ELEKTRİKSEL  
AKTİVİTESİNDEKİ ROLÜ**

**Semir ÖZDEMİR**

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Belma TURAN**

Bu tez Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından  
2003.08.09.110 proje numarası ile desteklenmiştir.

2004-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Biyofizik Doktora Programı  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.  
Tez Savunma Tarihi: 18/11/2004



Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Mehmet UĞUR  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Raportör



Prof. Dr. Belma TURAN  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Hakan GÜRDAL  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Nuhan PURALI  
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay Sayfası .....	ii
İçindekiler .....	iii
Önsöz .....	v
Simgeler ve Kısaltmalar .....	vi
Şekiller .....	vii
Çizelgeler .....	x
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Kalp Kasının Yapısı	1
1.1.1. Aksiyon Potansiyeli	1
1.1.2. Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi	4
1.2. Diyabet Hastalığı ve Özellikleri	5
1.2.1. Diyabetik Patolojiler: Kardiyomiyopati	7
1.3. Renin-Anjiyotensin Sistemi ve Önemi	9
1.4. Çalışmanın Amacı	14
<b>2. MATERYAL METOD</b>	<b>15</b>
2.1. Deney Grupları ve Diyabetin Oluşturulması	15
2.2. Aksiyon Potansiyellerinin ve Kasılma Yanıtlarının Kaydedilmesi	16
2.3. Kardiyak Miyositlerin İzolasyonu	18
2.4. Potasyum Akımlarının Kaydedilmesi	18
2.5. L-tipi $Ca^{2+}$ Akımlarının Kaydedilmesi	20
2.6. Hücre İçi Serbest $Ca^{2+}$ Derişimi Ölçümü	21
2.8. Kullanılan Kimyasallar	22
<b>3. BULGULAR</b>	<b>24</b>
3.1. Hayvanların Genel Durumları	24
3.2. Aksiyon Potansiyeli ile İlgili Parametreler	25
3.3. Akımlar	28
3.3.1. $K^+$ Akımları	28

3.3.2. L-tipi $Ca^{2+}$ Akımları	32
3.4. Kasılma ile İlgili Parametreler	36
3.5. Hücre İçi Serbest $[Ca^{2+}]_i$ Ölçümleri	38
3.5.1. Hücre İçi Bazal $Ca^{2+}$ Seviyeleri	38
3.5.2. Hücre İçi $Ca^{2+}$ Transientleri	40
3.5.3 Kafein Uyarımlı $Ca^{2+}$ Salımı	44
<b>4. TARTIŞMA</b>	45
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	51
<b>ÖZET</b>	53
<b>SUMMARY</b>	54
<b>KAYNAKLAR</b>	55
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	61



## ÖNSÖZ

Bu çalışmanın yapılması için gerekli olanakları sağlayan Prof. Dr. Belma TURAN'a, doktora eğitimim süresince ilgisini ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU'na ve çalışmalarımnda maddi/manevi katkısı olan değerli dostlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca, hücre içi  $Ca^{2+}$  transientlerinin analizinde kullanılan Excell uygulamasının geliştirilmesindeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Ogun ONARAN ve Uzm. Dr. Kemal SAYAR'a teşekkür ederim.

Varlıkları ve koşulsuz sevgileriyle bana her zaman güç veren sevgili Eşime ve Aileme de sonsuz şükranlarımı sunarım.

## SİMGELER ve KISALTMALAR

AP	Aksiyon potansiyeli
APD <sub>25</sub>	AP repolarizasyon fazının % 25'ine inmesi için geçen süre
APD <sub>50</sub>	AP repolarizasyon fazının % 50'sine inmesi için geçen süre
AP <sub>75</sub>	AP repolarizasyon fazının % 75'ine inmesi için geçen süre
AP <sub>90</sub>	AP repolarizasyon fazının % 90'ına inmesi için geçen süre
SERCA	Sarko/endoplazmik retikulum ATPaz
NCX	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> değiştokuşucu
SR	Sarkoplazmik retikulum
RAS	Renin-anjiyotensin sistemi
ACE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
Ang II	Anjiyotensin II
PKC	Protein kinaz C
PLC	Fosfolipaz C
DAG	Diaçilgliserol
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Hücre içi serbest Ca <sup>2+</sup> derişimi
AT <sub>1</sub>	Anjiyotensin II'nin tip 1 reseptörü
AT <sub>2</sub>	Anjiyotensin II'nin tip 2 reseptörü
PLB	Fosfolamban
CICR	Ca <sup>2+</sup> uyarımlı Ca <sup>2+</sup> salımı
DM	Diabetes mellitus
IDDM	İnsüline bağlı diabetes mellitus
NIDDM	İnslinden bağlı olmayan diabetes mellitus
STZ	Streptozotocin
TP	Tepe değerine ulaşma süresi.
RT <sub>50</sub>	Relaksasyonun % 50'sine ulaşması için geçen süre.
DT <sub>50</sub>	Maksimum değerin % 50'sine iniş süresi.
MAPK	mitojenle-aktiflenmiş protein kinaz

## ŞEKİLLER

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

**Şekil 1.2. Ventrikül hücrelerinde hücre içi Ca düzenlenmesi.** Alt grafik aksiyon potansiyeli, Ca tranziyeti ve kasılmanın zamansal değişimlerini göstermektedir. NCX,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  değiştokuşu; ATP, ATPaz; PLB, fosfolamban; SR, sarkoplazmik retikulum.

**Şekil 1.3. Sistemik renin-anjiyotensin sisteminin şeması ve olası fizyolojik etki alanları.** Ang I, anjiyotensin I; Ang II, anjiyotensin II; ADH, antidiüretik hormon.

**Şekil 1.4. Kardiyak hücrelerde anjiyotensinin sinyal iletim mekanizması.** PLC, fosfolipaz C;  $\text{IP}_3$ , inositol trifosfat; DAG, diaçil gliserol; PKC, protein kinaz C; MAPK, mitojenle-aktiflenen protein kinaz; PTKs, protein tirozin kinazlar; MKP-1, MAPK fosfataz-1; PTPaz, protein tirozin fosfataz; PP2A, serin/treonin fosfataz 2A; SH-PTP, Src homolojik yapısı içeren tirozin fosfataz; NO, nitrik oksid; JAK2, janus kinaz-2.

**Şekil 2.1. Sol ventrikül papiler kasından kaydedilen bir aksiyon potansiyeli eğrisi üzerinde ölçülen parametreler.** Kalın çizginin eğriyi kestiği nokta tepe değeri ve  $E_m$  dinlenme potansiyeli olmak üzere, çizgiden sağa doğru repolarizasyon evresinin maksimum değerinin %25, 50, 75 ve 90'ına düşmesi için geçen süreler gösterilmektedir.

**Şekil 2.2. Sol ventrikül papiler kasından kaydedilen bir kasılma eğrisi üzerinde ölçülen parametreler.** Kasılma eğrisinin en yüksek değeri genlik, bazal seviyeden tepe değerine ulaşma süresi, TP; Tepe değerinden relaksasyonun % 50'sine düşmesi için geçen süre,  $RT_{50}$  gösterilmektedir.

**Şekil 3.1. Örnek aksiyon potansiyeli kayıtları ve ortalama APD değerleri.** Kontrol (K), diyabet (D) ve 4 hafta boyunca günde 5 mg/kg candesartan-cilexetil verilmiş diyabet (D+Can) ve kontrol (K+Can) grupları için örnek aksiyon potansiyelleri ve ortalama değerler için çizdirilmiş histogram. Örnek sayısı dört grup için sırasıyla n=9, 10, 7, 9'dur. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. \*p<0,05 vs K grubu, †p<0,05 vs D grubu.

**Şekil 3.2. Gruplara ait örnek potasyum akımları ve akım yoğunluğu-zar potansiyeli değişim eğrileri.** a, Kontrol; b, Diyabet; c, Candesartan-cilexetil verilmiş diyabet gruplarını göstermektedir. Akımlar  $-80$  mV'tan 500 ms süreli pulslar uygulanarak elde edilmiştir.  $I_{K1}$  mutlak tepe değerlerinden;  $I_{ss}$  pulsun son 20 ms'lik kuyruk kesiminden;  $I_{to}$  ise  $-40$  ile  $70$  mV arasındaki akımların tepe değerlerinden  $I_{ss}$  çıkarılarak hesaplanmıştır. Değerler ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. \*p<0,05 vs K grubu, #p<0,05 vs D grubu.

**Şekil 3.3. Gruplar için  $I_{to}$  akımlarının kinetik analizleri.** Gruplardan elde edilen ortalama değerler ve Boltzman denklemlerinin uygulanması ile çizdirilmiş aktivasyon ( $I/I_{max}=[1+\exp(V_{1/2}-V_m)/k]^{-1}$ ) ve inaktivasyon ( $I/I_{max}=[1+\exp(V_m-V_{1/2})/k]^{-1}$ ) eğrileri.  $V_{1/2}$ , aktivasyon veya inaktivasyon'un %50 değerine ulaştığı potansiyel ve  $k$  eğim parametresidir. Reaktivasyon değerlerine ise,  $I/I_{max} = [1-\exp(-t/\tau)]$  üssel fonksiyon denklemi uydurulmuştur. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir.

**Şekil 3.4. L-tipi kalsiyum kanal akımı.** Üstte, K ve D gruplarına ait örnek  $I_{CaL}$  kayıtları (a, b); Altta, ve zar potansiyeline göre ölçülen akım yoğunluklarının ortalamasından elde edilen değerlerin değişimini gösteren grafik ve akımın kayıt protokolü. Değerler ortalama  $\pm$  SEM ile temsil edilmiştir.

**Şekil 3.5. Boltzman denkleminin uydurulması ile elde edilen aktivasyon ve inaktivasyon eğrileri.** Aktivasyon değerleri her potansiyel değerindeki akım genliğinin maksimum akım genliğine oranlanması ile elde edilmiştir. İnaktivasyon akım değerleri ise alttaki grafikte gösterilen protokole göre kaydedilmiştir. Değerler ortalama  $\pm$  SEM ile temsil edilmiştir.

**Şekil 3.6. Kasılma parametrelerinin değişimi.** Kontrol (K), diyabet (D) ve 4 hafta boyunca günde 5 mg/kg/gün candesartan-cilexetil verilmiş diyabet (D+Can) ve kontrol (K+Can) grupları için örnek kasılma eğrileri (A) ve ortalama değerler için çizdirilmiş histogram (B). Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir. \* $p<0,05$  vs K grubu,  $\dagger p<0,05$  vs D grubu.

**Şekil 3.7. Grupların hücre içi serbest bazal  $Ca^{2+}$  seviyeleri.** Dinlenme durumundaki kontrol (K), diyabet (D), 4 hafta boyunca 5 mg/kg/gün candesartan-cilexetil verilen kontrol (K+Can) ve diyabet (D+Can) kardiyomyositlerinden kaydedilen ~20 s'lik sinyallerin ortalama değerleri ve standart hatalar (ortalama $\pm$ SEM). \* $p<0,05$  vs K grubu,  $\dagger p<0,05$  vs D grubu.

**Şekil 3.8. Hücre içi  $Ca^{2+}$  transientleri.** Bir kontrol kardiyomyositinden uyarın etkisinde belli bir zaman boyunca kaydedilen hücre içi  $Ca^{2+}$  transientleri ve hücre uyarını olarak elektriksel alan uyarısının uygulama biçimi.

**Şekil 3.9. Gruplara ait örnek  $Ca^{2+}$  transientleri ve üzerlerine uydurulmuş fonksiyon (gama dağılım fonksiyonu) eğrisi (kesikli çizgi).** Kontrol (K), diyabet (D), 4 hafta boyunca 5 mg/kg/gün candesartan-cilexetil verilmiş diyabet (D+Can) gruplarının kardiyomyositleri ve 100 nM BIM ile 4 saat inkübe edilmiş diyabetik sıçan kardiyomyositleri (BIM İnc+D) temsil edilmiştir. Transientler 10 ms süreli, 20-30 V'luk pulsların 0.2 Hz frekansında uygulanmasıyla elde edilmiştir.

**Şekil 3.10. Alan uyarısı ile kaydedilmiş  $Ca^{2+}$  transientleri.** Transientlerden hesaplanan maksimum genliklerin ve kinetik parametrelerin ortalama değerleri (ortalama $\pm$ SEM). A; maksimum genlik ( $\Delta F_{340/380}$ ), B; tepeye çıkış süresi (TP), C; maksimum değer'in %50'sine iniş süresi (DT<sub>50</sub>). \* $p<0,05$  vs K grubu,  $\dagger p<0,05$  vs D grubu.



**Şekil 3.11. Kafein (10 mM) uyarımlı  $Ca^{2+}$  salımı sonuçları.** Ventrikül hücreleri 120 s süreyle 0,2 Hz'lik frekansta uyarıldıktan sonra uyarı kesilmiş, 30 s sonra kafein mikropipet ile banyo ortamına eklenmiştir. Çerçevesi bölüm örnek kayıtları göstermektedir. Gruplara ait kısaltmalar diğer şekiller ile aynıdır. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir. \*P<0,05 vs K grubu, †p<0,05 vs D grubu.



## ÇİZELGELER

**Tablo 3.1.** Hayvanların genel parametreleri.

**Tablo 3.2.** Hayvanların papiler kas aksiyon potansiyeli parametreleri.

**Tablo 3.3.** Kardiyomiyositlerden kaydedilen  $I_{to}$  akım yoğunluğu değerleri ve kinetik parametreleri.

**Tablo 3.4.** Kardiyomiyositlerden kaydedilen  $I_{CaL}$  akımlarının yoğunluğu ve kinetik parametrelerinin değerleri.

**Tablo 3.5.** Deney hayvanlarının papiler kas kasılma parametreleri.

**Tablo 3.6.** Kardiyomiyositlerden kaydedilen hücre içi bazal  $Ca^{2+}$  değerleri

**Tablo 3.7.** Kardiyomiyositlerden kaydedilen hücre içi  $Ca^{2+}$  transientlerinin analiz sonuçları.

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Kalp Kasının Yapısı

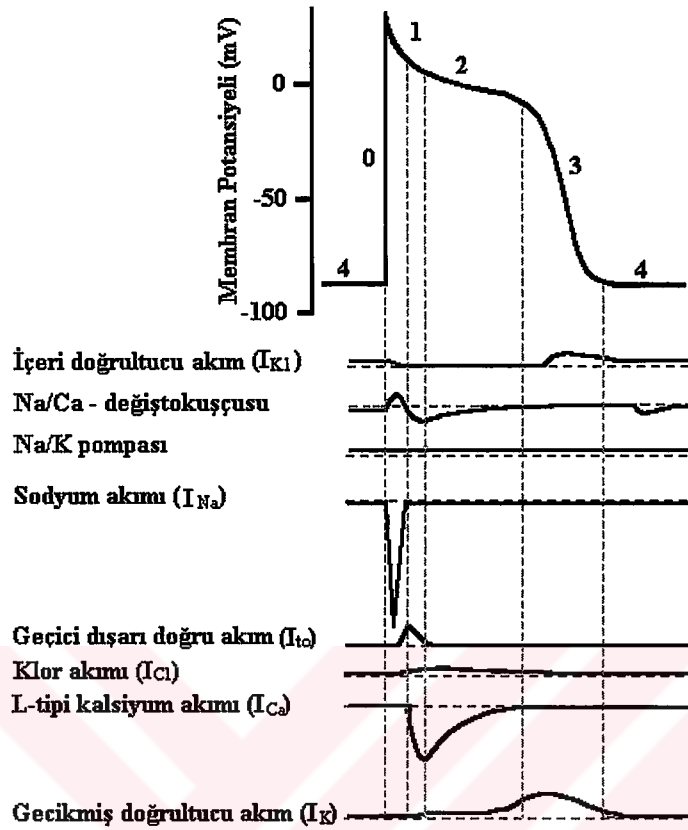
Vücudun tüm doku ve organlarına kan pompalayan kalp, göğüs boşluğunda yer alan fibröz bir kılıf olan perikardiyum ile sarmalanmış, kas yapısında bir organdır. Kalbin duvarları temel olarak miyokardiyum denilen kardiyak-kas hücrelerinden oluşur. Miyokardiyumun kalp-kası hücreleri birbirine sıkıca bağlanmış tabakalar halinde düzenlenmiş olup, kanın bulunduğu odacıkları bütünüyle sarar. Bir odacığın duvarları kasıldığında sıkılmış bir yumruk gibi bir araya gelir ve çevreledikleri kana basınç uygularlar. Komşu hücreler interkale diskler denen yapılar aracılığı ile uc uca eklenirler. Bunların içinde hücreleri bir arada tutan ve miyofibrillerin de bağlandığı desmozomlar vardır (Vander ve ark., 1994; s.: 410).

Kalpte uyarı bir noktadan başlayarak iletim sistemi aracılığı ile tüm kalbe yayılır. Uyarının iletimi gap junction denilen hücreler arası bağlantılar yoluyla gerçekleşir.

### 1.1.1. Aksiyon Potansiyeli

Kalp kasının kasılması diğer kaslarda da olduğu gibi kası oluşturan hücrelerin zarlarının depolarizasyonu ile tetiklenir. Hücrelerin birbiriyle bağlantılı (gap junction) olmalarından dolayı oluşan aksiyon potansiyeli (AP) bir hücreden diğerine geçer. Böylece, başlangıçta bir hücrenin uyarılması diğer bütün hücrelerin uyarılmasıyla sonuçlanır (Wahler, 1997).

Aksiyon potansiyeli oluşmasının altında zar geçirgenliğindeki değişiklikler yatmaktadır. Dinlenim durumunda hücre zarı potasyum iyonlarına daha geçirgen olduğu için dinlenim zar potansiyeli potasyum denge potansiyeline yakın bir değerdedir (Wahler, 1997).



**Şekil 1.1. Ventrikül aksiyon potansiyelinin evreleri ve onlara karşılık gelen iyon akımları. (Mukherjee ve Spinale, 1999).**

Kalp AP'nin konfigürasyonu çeşitli fazlara bölünebilir. Şekil 1.1'de ventrikül hücresi AP'nin 5 fazı ve temel olarak her fazdan sorumlu olan akımlar görülmektedir. Faz 0 AP'nin sıçraması; faz 1 erken repolarizasyon evresi; faz 2 plato evresi; faz 3 asıl repolarizasyon fazı; ve faz 4 dinlenme potansiyeli evresidir.

- i) **Faz 0:** AP'nin  $\text{Na}^+$  akımlarına bağlı olan hızlı sıçrama evresidir. Bu akımın hızlı aktivasyon ve inaktivasyon kinetikleri vardır. 1 ms'de tepe değerine ulaştıktan sonra kendiliğinden azalır (inaktivasyon). Ufak bir depolarizasyonla  $\text{Na}^+$  kanalları açılmaya başladığında, elektrokimyasal gradyentten dolayı  $\text{Na}^+$  hücre içine girmeye başlar.

Bu durum hücrenin daha fazla depolarize olmasına ve depolarize oldukça da yeni  $\text{Na}^+$  kanallarının açılmasına neden olur.

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

Ayrıca, AP'ye katkıda bulunan pompalar da bulunmaktadır: Küçük bir akım oluşturmakla birlikte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pompasının asıl işlevi akım üretmekten çok AP'yi oluşturacak iyonik gradyentleri korumaktır (Wahler, 1997). Bununla birlikte,

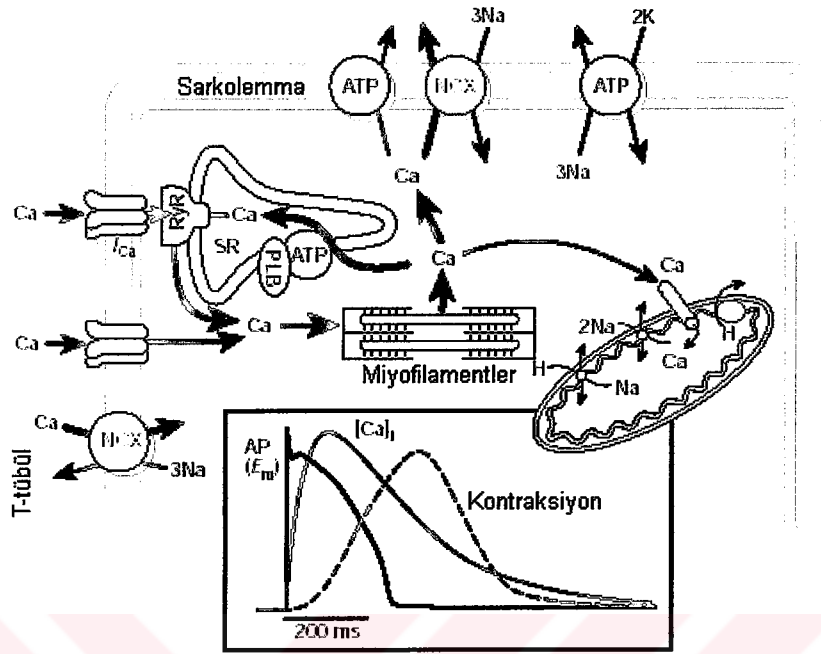
$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -değiştokuşçusu (NCX) normal modunda dışarı attığı her  $\text{Ca}^{2+}$  için içeri 3  $\text{Na}^+$  taşırken, plato evresinin başlangıcında ters yönde çalışarak önemli bir akım oluşturmaktadır. Bu yüzden, NCX'in AP'nin şekline de etkisi olduğu ileri sürülmüştür (Janvier ve Boyett, 1996) .

### 1.1.2. Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi

Uyarılma kasılma çiftlenimi kasılma kuvvetini oluşturan ve kalbin işlevini yerine getirmesini sağlayan organize sinyal işleme yolaklarının bütünüdür. Bu etkinlik, kardiyak hücre membranının depolarizasyonu sonucu açılan L-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının aracılığıyla hücre içine  $\text{Ca}^{2+}$  girişi ile başlar (şekil 1.2). Küçük miktardaki bu  $\text{Ca}^{2+}$  akışı sarkoplazmik retikulum (SR) yüzeyindeki ryanodin reseptörlerinden (RyR) 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 sitozolik serbest  $\text{Ca}^{2+}$  konsantrasyonunda ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 100 nM olan diastolik seviyeden, 1  $\mu\text{M}$ 'lık sistolik seviyeye ani bir artış gerçekteşir (Bracken ve ark., 2003). Genellikle, SR'dan  $\text{Ca}^{2+}$  salımının temel mekanizması kabul edilen bu olaya “ $\text{Ca}^{2+}$ -uyarımlı  $\text{Ca}^{2+}$ -salımı” (CICR) denir (Bers, 2002; Bracken ve ark., 2003).

Kasılma içi,  $\text{Ca}^{2+}$ 'un troponin C miyofilamentine bağlanıp kontraktil makineyi harekete geçirmesiyle başlar. 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 gerçekteşir (Bers, 2002; Bracken ve ark., 2003).

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



**Şekil 1.2. Ventrikül hücrelerinde hücre içi Ca düzenlenmesi.** Alt grafik aksiyon potansiyeli, Ca tranziyeti ve kasılmanın zamansal değişimlerini göstermektedir. NCX,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  değiştokuşu; ATP, ATPaz; PLB, fosfolamban; SR, sarkoplazmik retikulum (Bers, 2002).

## 1.2. Diyabet Hastalığı ve Özellikleri

Diyabet (Diabetes Mellitus) karbohidrat, yağ, elektrolit ve protein metabolizmasındaki bozukluklar neticesinde, uzun vadede çeşitli akut ve kronik komplikasyonlara yol açan metabolik bir hastalıktır (Stanley ve ark. 1997; Mahgoub ve Abd-Elfattah, 1998). Diyabet insülin yetmezliği, insülin etkinliğinin bozulması veya her ikisinin de sonucu olarak açlık kan şekerinin yükselmesi ve glikoz toleransının bozulması ile kendini gösterir. Etiyolojisi, tarihçesi ve klinik dışavurumları temel alınarak iki ana grupta sınıflandırılmıştır; tip 1 diyabet (insüline-bağlı diyabet (IDDM)) ve tip 2 diyabet (insüline-bağlı olmayan diyabet (NIDDM)) (Bracken ve ark., 2003).

Tip 1 diyabet her yaşta olmakla birlikte daha çok çocuklarda ve genç yetişkinlerde görülmektedir. Hastalığın kesin nedeni tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, pankreatik beta ( $\beta$ ) hücrelerinin otoimmün dejenerasyonu ve/veya çevresel faktörlerin sonucu olduğu düşünülmektedir. Tip 1 diyabetin nedeni hakkındaki en yaygın kanı Langerhans adacıklarındaki pankreatik  $\beta$ -hücrelerinin otoimmün yoldan tahribatı ile oluştuğu yönündedir. Bununla birlikte, kesin etiyojisi karmaşıktır ve henüz bütünüyle anlaşılamamıştır (Bracken ve ark., 2003).

Tip 1 diyabet'in karakteristik özelliği, dolaşımdaki plazma insülin seviyesinin düşmesiyle sonuçlanan insülin üretiminin kaybolmasıdır (Bracken ve ark., 2003). Bu insülin yetmezliği katekolaminler, kortizol, glukagon ve büyüme hormonları gibi katabolik elemanların varlığında yağ dokusundaki lipolizi (yağ yıkımı) arttırmaktadır (Bracken ve ark., 2003). Bunun sonucunda dolaşıma yağ asitleri salınmakta, bunlar da karaciğerde keton yapılar, asetoasetik aside ve 3-hidroksibutirik aside dönüşmek üzere okside olmaktadır. Bütün bunlar asidozis denilen duruma katkıda bulunmaktadır. Ketoasidozis'in tedavi edilmediğinde diyabetik koma ve ölümle sonuçlanabilecek semptomları arasında polidipsi, poliüri, kilo kaybı, ayak krampları ve zayıflık bulunmaktadır (Amos ve ark., 1997). Bunun yanında birçok organ ve dokuda ölümcül hasarlara da neden olmaktadır.

Diyabetin en yaygın olanı tip 2 diyabettir. Bu form poligenik olmakla ve genlerden etkilenmekle birlikte çevre de önemli bir faktördür. Hastalığın karakteristik özellikleri insülin direnci ve bağıl insülin yetmezliğidir (Bracken ve ark., 2003). Ancak bu hastalarda insülin seviyeleri genellikle normaldir. Tip 2 diyabette ortaya çıkan sorunların kaynağı pankreas olmayıp, hücre düzeyinde insülin reseptöründeki ve reseptör sonrası basamaklardaki dirençtir (Dhalla ve ark., 1985).

Diyabeti anlamak ve tedavisine yönelik yeni yaklaşımlar geliştirmek amacıyla çoğunlukla hayvanlarda deneysel diyabet modelleri oluşturulmaktadır. Bununla birlikte, çok daha yaygın olmasına rağmen, karmaşık etiyojisi ve yeterince anlaşılamamış olmasından dolayı diyabetin tip 2 hayvan modellerinde çok daha az çalışma yapılabilmektedir. Bu hastalığa yönelik geliştirilen birçok genetik ve kimyasal



model deneylerinde problemler ortaya çıkmakta ve diyabetten bağımsız komplikasyonlar gelişmektedir. Buna karşılık tip 1 diyabetin deneysel modelleri kimyasal maddelerle kolaylıkla yapılabilir (Yu ve ark., 1997; Szkudelski, 2001; Bracken ve ark., 2003). Hayvana verilen kimyasal pankreasın  $\beta$ -hücrelerinin ölümüne yol açmaktadır. Bu amaçla kullanılan diyabetojenik iki kimyasal ajan alloxan ve streptozotocin (STZ)'dir. STZ (2-deoxy-2-[[[(methylnitrosamino) carbonyl]amino]-D-lucopyranose)  $\beta$ -hücrelerine yüksek seçicilik gösterirken, alloxan'ın özgül olmayan nekrotik etkileri olduğu ifade edilmiştir (Szkudelski, 2001; Bracken ve ark., 2003).

### 1.2.1. Diyabetik Patolojiler: Kardiyomiyopati

Kardiovasküler komplikasyonlar diyabetik hastalardaki marazi ve ölümcül vakaların en önemli nedenidir. Diyabetik koşullarda aterosklerotik vasküler hastalıklar sıkça görülmesine rağmen, bunlardan bağımsız olarak kalpte gelişen ve çeşitli fonksiyon bozukluklarına yol açan bir tip kardiyomiyopatinin olduğu da bilinmektedir (Fein ve Sonnenblick, 1985; Galderisi ve ark., 1991). Diyabetik kardiyomiyopati erken diastolik ve geç sistolik fonksiyon bozukluklarına neden olan bir hastalıktır. Diyabetin yol açtığı bu yetmezliklerin altında yatan etkenler; lif kısalma ve gevşeme hızındaki azalma, düşük miyozin ATPaz aktivitesi, miyozin izoformlarında  $V_1$  (hızlı)'den  $V_3$  (yavaş)'e kayma, SR  $Ca^{2+}$  alımında bozulma, insüline duyarlı glukoz taşıyıcısında (GLUT4) azalma vb. hücre fonksiyon bozukluklarıdır (Flack, 1998; Mahgoub ve Abd-Elfattah, 1998).

İnsülin yetmezliği olan diyabetik sıçanlarla yapılan deneylerde papiler kasın kısalma ve gevşeme kinetiklerinin yavaşladığı, gerilme kuvvetinin ise azaldığı gösterilmiştir (Fein ve ark., 1980). Trost ve ark. (2002) da tip 1 diyabetin etkisiyle fare papiler kasında kasılma ve gevşeme sürelerinin uzadığını, buna karşılık gerilme kuvvetinin azaldığını ifade etmişlerdir. Bunun yanında, deneysel diyabet modeli oluşturulan sıçanlarda sol ventrikül papiler kasında kasılma ve gevşeme evrelerinin yavaşlayıp

uzadığını, ancak gerilme kuvvetinin değişmediğini gösteren bulgular da ortaya konmuştur (Ishikawa ve ark., 1999; Ren ve ark., 1999).

Diyabetik kalplerden kaydedilen aksiyon potansiyellerinin kontrollere göre önemli ölçüde uzamış olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Jourdon ve Feuvray, 1993; Shimoni ve ark., 1994; Ayaz ve ark., 2004). Bu uzamanın iyonik akımlarla ilişkisi araştırılmış ve  $Ca^{2+}$  akımlarının değişmediği (Tsuchida ve ark., 1994), geçici dışarı doğru (transient outward;  $I_{to}$ ) ve kararlı-durumdaki (steady-state;  $I_{ss}$ ) pasif  $K^+$  akımlarının ise azaldığı bildirilmiştir (Jourdon ve Feuvray, 1993; Shimoni ve ark., 1994). Bununla birlikte, içeri doğrultucu (Inward rectifier;  $I_{K1}$ )  $K^+$  akımının diyabetli kalp hücrelerinde değişmediği, fakat gecikmiş doğrultucu (delayed rectifier;  $I_K$ ) akımının azaldığı ve bunun AP'nin geç repolarizasyon fazındaki uzamaya katkısı olduğu ileri sürülmüştür (Jourdon ve Feuvray, 1993).

Hücre içi  $Ca^{2+}$  seviyesi kalbin kasılma sürecindeki en önemli ve belirleyici değişkenlerdendir. Bu yüzden, birçok çalışmada diyabetli kalpte gözlenen kasılma bozukluklarının hücre içi  $Ca^{2+}$  homeostazındaki değişikliklerle ilişkili olduğu ortaya konulmuş (Ishikawa ve ark., 1999; Trost ve ark., 2002; Norby ve ark., 2004), ancak bu konuda bir uzlaşmaya varılamamıştır. Literatürde diyabetik kardiyomiyositlerde hücre içi  $Ca^{2+}$ 'un bazal seviyesinin arttığına (Norby ve ark., 2004), değişmediğine (Yu ve ark., 1997), ya da azaldığına (Hayashi ve Noda, 1997) ilişkin bulgulara rastlanmaktadır. Bunun yanında, elektriksel uyanlarla kaydedilen  $Ca^{2+}$  transientlerinin genliklerinin azaldığı, kinetik parametrelerinin ise uzadığı bildirilmiştir (Choi ve ark., 2002; Lagadic-Gossmann ve ark., 1996; Hayashi ve Noda, 1997).

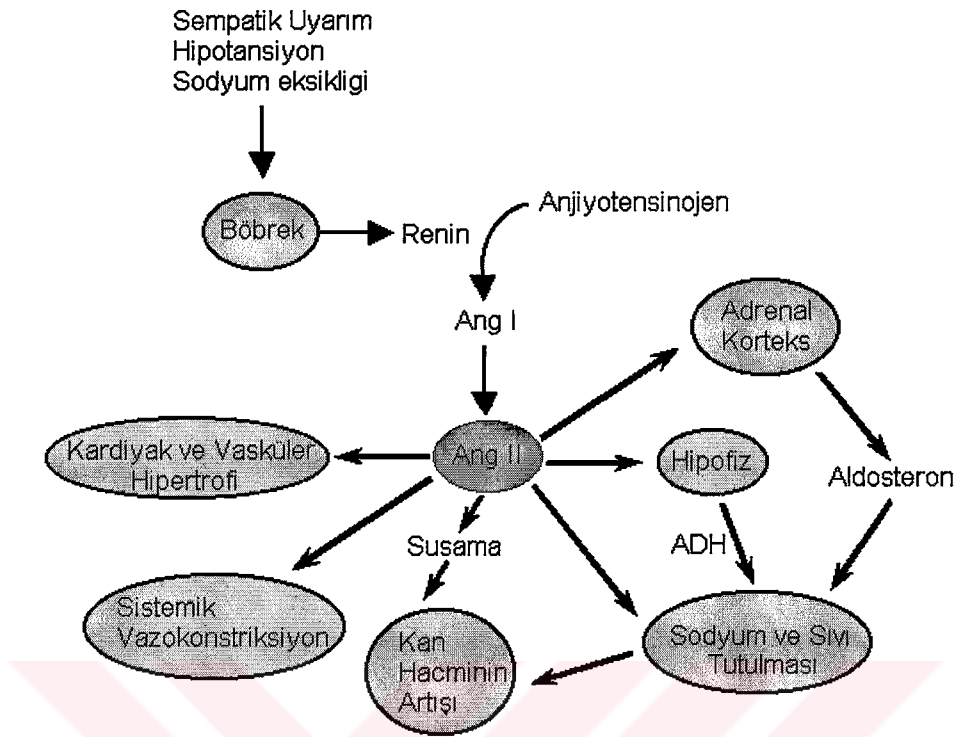
Diyabetik kalpte gözlenen fonksiyon bozukluklarının hücre içi serbest  $Ca^{2+}$  değişimlerini düzenleyen elemanlardaki ve/veya miyofibrillerin fosforilasyonundaki anormalliklere bağlı olduğu düşünülmektedir (Fein ve ark., 1980, Dhalla ve ark., 1998). Deneysel sıçan modelleriyle yapılan çalışmalarda diyabetik kalpte NCX, SERCA, RYR, fosfolamban (PLB) gibi hücre içi serbest  $Ca^{2+}$  düzenleyici proteinlerin seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir (Teshima ve ark., 2000; Hattori ve

ark., 2000; Norby ve ark., 2002; Choi ve ark., 2002). Bunun yanında, NCX ve SERCA'nın aktivitelerinde de bir azalma olduğu bildirilmiştir (Yu ve ark., 1997; Dhalla ve ark., 1998; Choi ve ark., 2002). Ayrıca, birçok çalışmada diyabetik kalpte arttığı gösterilmiş olan protein kinaz C (PKC)'nin (Ishii ve ark., 1998; Shimoni ve Liu, 2003) troponin I fosforilasyonu yoluyla aktomyozin ATPaz aktivitesini ve aktin-miyozin etkileşimini düşürdüğü ileri sürülmektedir (Malhotra ve ark., 1997; Dhalla ve ark., 1998). Bunun yanında, Shimoni (1999) PKC aktivasyonunun normal ventrikül hücrelerinde K<sup>+</sup> akımlarını baskıladığını, buna karşılık PKC inhibitörü ile inkübe edilen diyabetli hücrelerde akımların düzeldiğini göstermiştir.

### 1.3. Renin-Anjiyotensin Sistemi ve Önemi

Renin-anjiyotensin sistemi (RAS) vasküler tonus, sıvı ve elektrolit dengesi ve sempatik sinir sistemini etkileyerek kardivasküler homeostasiste önemli rol oynayan enzimatik bir yapıdır (Dinh ve ark., 2001). RAS'nin biyolojik etkisi esas olarak yüksek derecede aktif bir oktapeptid olan anjiyotensin II (Ang II) yoluyla gerçekleşir. Bu sistem geleneksel olarak, dolaşan bir endokrin sistemi olarak tanımlanmaktadır.

Renin RAS sisteminin birincil elemanı olup, juxtaglomerular hücrelerden sentezlenip kana salınan bir proteindir. Bu protein, küçük bir polipeptid olan Anjiyotensin I (Ang I)'in büyük bir plazma proteini olan anjiyotensinojenden ayrılmasını sağlayan enzimatik etkiyi yapar. Ang I daha ileri ayrışmalara uğrayarak Ang II'yi oluşturur. Bu dönüşüm ise anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) olarak bilinen enzimle gerçekleşir (Vander ve ark., 1994; s.: 536). Buna ek olarak, Ang II chymase, katepsin G, kimostatın-duyarlı Ang II-yapıcı enzim (CAGE), doku plazminojen aktivatörü ve tonin gibi non-ACE ve non-renin enzimlerle üretilebilmektedir (Dinh ve ark., 2001). Sistemik renin-anjiyotensin sistemine ilişkin genelleştirilmiş bir blok diyagram Şekil 1.3 de görülmektedir.



**Şekil 1.3. Sistemik renin-anjiyotensin sisteminin şeması ve olası fizyolojik etki alanları.** Ang I, anjiyotensin I; Ang II, anjiyotensin II; ADH, antidiüretik hormon (Klabunde, 2004).

Ancak, son yıllarda RAS sisteminin elemanlarının (renin, anjiyotensinojen, Ang I, Ang II ve ACE) dokulardaki varlığının aydınlatılması, lokal RAS'ın kalpte ve diğer organlarda yer aldığı düşüncesini güçlendirmiştir (De Mello ve Danser, 2000; Dinh ve ark., 2001).

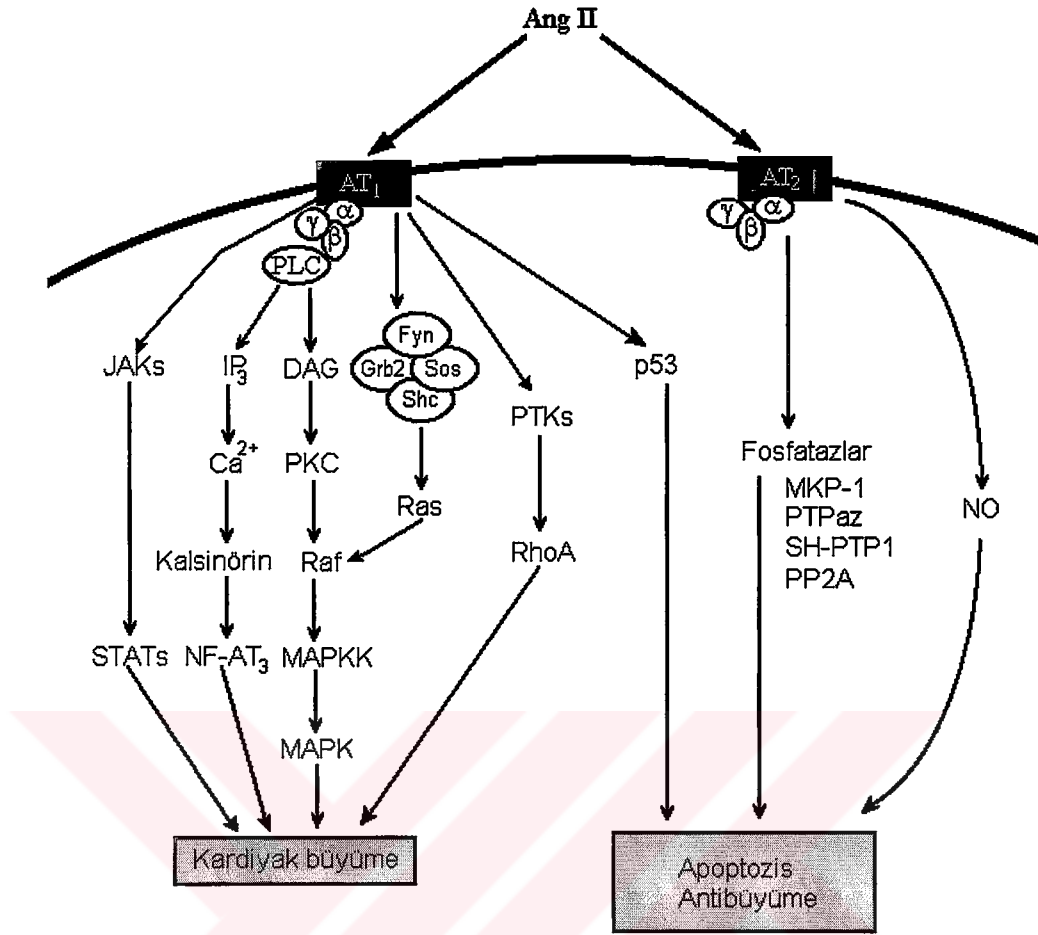
### 1.3.1. Anjiyotensin II Reseptörleri

Ang II'nin kardiyak dokudaki etkisi  $AT_1$  ve  $AT_2$  gibi iki tip reseptörün aktivasyonuna bağlıdır.  $AT_1$  reseptörünün iki alt tipi vardır:  $AT_{1A}$  ve  $AT_{1B}$ .  $AT_{1A}$  reseptörlerinin kardiyomiyositlerde in vivo kan basıncı düzenleyicisi ve etkin büyüme stimülatörleri olmalarına karşın,  $AT_{1B}$  reseptörleri  $AT_{1A}$ 'nın yokluğunda vasküler tonusun kontrolünde yer alır (De Mello ve Danser, 2000).

AT<sub>1</sub> reseptörleri esas olarak beyin, adrenal bezler, kalp, damar sistemi ve böbrekte yer almaktadır. AT<sub>2</sub> reseptörleri ise çoğunlukla fetal dönemde eksprese olmaktadır. Ancak, doğum sonrasında hızla azalmaktadırlar. Temel olarak; beyin, kalp, adrenal medulla, böbrek ve üreme dokularında bulunmaktadırlar (Dostal, 2000; De Mello ve Danser, 2000; Dinh ve ark., 2001).

Ang II reseptörlerinin sinyal iletim mekanizması iyi bilinmektedir. Ang II'nin bilinen vazokonstriksiyon, aldosteron salımı, sempatik iletimin uyarılması ve hücre büyümesi gibi hemen tüm biyolojik etkileri AT<sub>1</sub> reseptörü aracılığı ile gerçekleştirilir. AT<sub>2</sub> reseptörünün ise fonksiyonel rolü tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, anti-proliferasyon, apoptozis, farklılaşma ve vazodilatasyonda rolü olabileceği düşünülmektedir (Dostal, 2000; De Mello ve Danser, 2000; Dinh ve ark., 2001).

AT<sub>1</sub> reseptörü G-protein aracılı reseptör ailesinin moleküler ağırlığı 65 kDa olan bir üyesidir. Heteromerik G proteinlerinden G<sub>qα</sub> veya G<sub>iα</sub> ile etkileşmektedir. Ang II'nin bağlanması ve AT<sub>1</sub> reseptörlerinin aktivasyonu, ya G<sub>q</sub> aracılığı ile fosfolipaz C (PLC)'nin uyarılmasıyla ya da G<sub>i</sub>'nin adenilat siklazı (AC) inhibe etmesiyle sonuçlanmaktadır (Chung ve Unger, 1998). PLC'nin uyarılmasını takip eden protein kinaz C (PKC) aktivasyonu hücre içi depolardan Ca<sup>2+</sup> salınması ve L-tipi Ca<sup>2+</sup> kanallarının açılması gibi çeşitli olayların başlamasına neden olmaktadır (Chung ve Unger, 1998; Dostal, 2000; Baker ve ark., 1992). Buna ek olarak, tirozin kinazın ve mitojenle-aktiflenmiş protein kinaz (MAPK)'ın fosforilasyonu gerçekleşmektedir (Dostal, 2000; De Mello ve Danser, 2000; Dinh ve ark., 2001).



**Şekil 1.4. Kardiyak hücrelerde anjiyotensinin sinyal iletim mekanizması.** PLC, fosfolipaz C; IP<sub>3</sub>, inositol trifosfat; DAG, diaçil gliserol; PKC, protein kinaz C; MAPK, mitojenle-aktiflenen protein kinaz; PTKs, protein tirozin kinazlar; MKP-1, MAPK fosfataz-1; PTPaz, protein tirozin fosfataz; PP2A, serin/treonin fosfataz 2A; SH-PTP, Src homolojik yapısı içeren tirozin fosfataz; NO, nitrik oksid; JAK2, janus kinaz-2 (Dostal, 2000).

AT<sub>2</sub> reseptörleri kinin/NO/cGMP sistemini aktive etmekte ve protein tirozin fosfataz (PTP) ve serin/treonin fosfataz'ı uyarmaktadır. PTP stimülasyonu AT<sub>1</sub> reseptörünün aktive ettiği MAPK'yı etkisiz hale getirmektedir. Buna ek olarak, AT<sub>1</sub> reseptör uyarımının mitojenik veya hipertrofik cevabının kaynağı olan ekstraselüler sinyal-regüleli kinaz'ın aktivasyonu, AT<sub>2</sub> reseptörünün uyardığı serin/treonin fosfataz 2A ile tersine çevrilebilir. Bunlar, iki reseptör sistemi arasında birbirine zıt yönde etkileşimin olabileceğini düşündürmektedir. Kardiyak hücrelerde anjiyotensinin sinyal iletim mekanizması Şekil 1.4 de genel olarak şematize edilmiştir.

### 1.3.2. Anjiyotensin II ve Diyabet İlişkisi

Son yıllarda, RAS sisteminin elemanlarının (renin, anjiyotensinojen, Ang I, Ang II ve ACE) dokulardaki varlığının aydınlatılması, lokal renin-anjiyotensin sisteminin kalpte ve diğer organlardaki fonksiyon bozukluklarında yer aldığı düşüncesini güçlendirmiştir (De Mello ve Danser, 2000).

Anjiyotensin II reseptör blokörlerinin kullanılmasının diyabetin yol açtığı kalp yetmezliklerini, perfüzyon bozukluklarını ve glikoz taşıyıcılarındaki azalmayı engelleyebildiğine ilişkin bulgulara rastlanmıştır (Hoenack ve Roesen, 1996; Dhalla ve ark., 1998). Hipergliseminin Ang II reseptör sayısını arttırdığı bilinmekte (Sechi ve ark., 1994; Brown ve ark., 1997) ve bu reseptörler üzerinden diaçilgliserol (DAG) oluşturarak PKC'nin çeşitli izoformlarını aktive ettiği varsayılmaktadır. AT<sub>1</sub> reseptör blokajının hiperglisemik durumda bile enzim dağılımını insülin gibi normale çevirmesi (Malhotra ve ark., 1997), hipergliseminin PKCε aktivasyonunu bu reseptör aracılı yoldan gerçekleştirdiğini düşündürmektedir (Ishii ve ark., 1998; Shimoni, 1999).

Shimoni (2001) diyabetli sıçan kalplerinde uzadığı bilinen AP süresinin hem AT<sub>1</sub> blokörü olan valsartan hem de ACE inhibitörleri ile kısaldığını ve bu uzamada rolü olan geçici dışarı doğru potasyum akımlarındaki (I<sub>to</sub>) azalmanın normale döndüğünü gözlemiştir (Shimoni, 2001). Yine Fiordaliso ve ark. (2000) STZ uygulaması ile kalpte RAS elemanlarının ekspresyonunda artış olduğunu ve AT<sub>1</sub> blokörü olan losartan uygulamasının hem diyabetin yol açtığı hücre ölümünü hem de artan Ang II seviyesini düşürdüğünü göstermişlerdir. Bununla birlikte, köpek epikard miyositleri Ang II ile inkübe edildiğinde diyabetle benzer şekilde, K<sup>+</sup> akımlarının azaldığı ve losartan uygulamasının bu etkiyi ortadan kaldırdığı gözlenmiştir (Yu ve ark., 2000). Ayrıca, Aiello ve ark. (2001) Ang II'nin kardiyak Ca<sup>2+</sup> akımlarını uyardığını ve bu etkinin yine PKC aktivasyonu ile gerçekleştiğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada, aynı etkinin PKC'nin doğrudan aktivasyonu ile de gözlendiği ve hem AT<sub>1</sub> blokörü uygulamasının hem de özgül PKC inhibitörlerinin bu artışı baskıladığı gösterilmiştir.

#### 1.4. Çalışmanın Amacı

Bugüne kadar elde edilen bulgular bize, diyabetli kalbin elektriksel ve mekanik aktivitesinde gözlenen anormalliklerden hücre zarı iyonik akımlarındaki değişikliklerin ve hücre içi  $Ca^{2+}$  homeostazının bozulmasının sorumlu olduğunu düşündürmektedir. Bunun yanında, hiperglisemik durumda RAS sisteminin etkinliğinin artmış olması (Sechi ve ark., 1994; Brown ve ark., 1997; Malhotra ve ark., 1997; Malhotra ve ark., 2001; Shimoni, 2001), Ang II'nin ve aktive ettiği habercilerin bu değişikliklerde önemli bir rolü olabileceğini göstermektedir. Bu nedenlerle, çalışmamızda  $AT_1$  reseptör blokörü olduğu ileri sürülen ve bu amaçla ilaç şeklinde de kullanılan candesartan-cilexetil'in deneysel diyabet modelinde kalpte oluşan elektriksel ve mekanik değişikliklere etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır. Ayrıca, hücre içi serbest  $Ca^{2+}$  değişimleri ve akımların ölçülmesi yoluyla olası etkilerin iyonik temelini açıklığa kavuşturulması hedeflenmiştir. Bunlara ek olarak, ventrikül hücreleri PKC inhibitörü olan bisindolylmaleimid I (BIM) ile inkübe edilerek etkinin kullandığı sinyal yolunun aydınlatılması amaçlanmıştır. Böylece, bir bütün olarak bu çalışmanın, diyabetik kardiyomiyopatinin iyonik temellerinin anlaşılmasına ve Ang II'nin diyabetik kalp yetmezliğindeki rolünün açıklığa kavuşturulmasına katkı sağlayacağı beklenmektedir.



## 2. MATERYAL METOD

### 2.1. Deney Grupları ve Diyabetin Oluşturulması

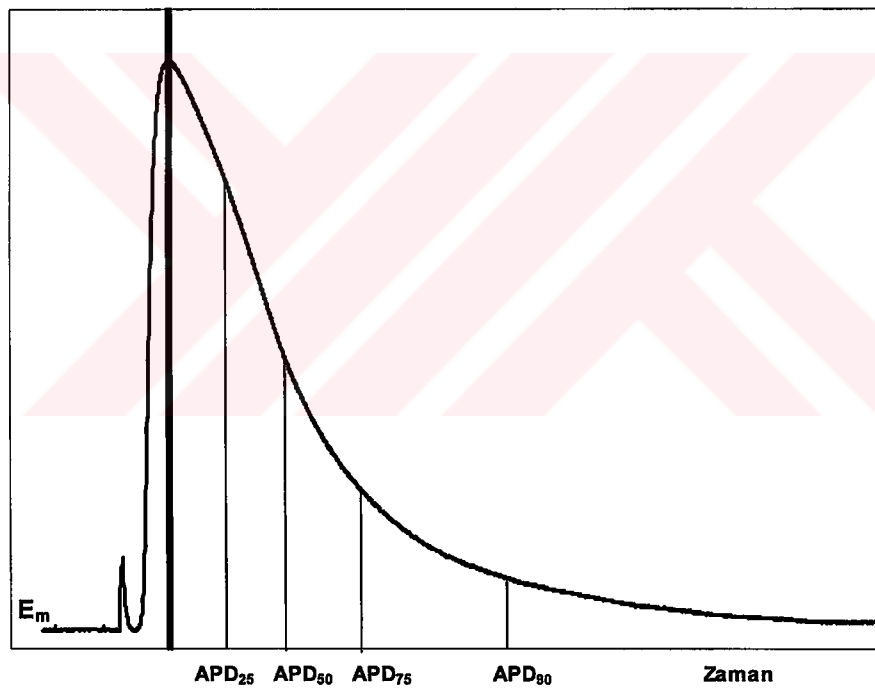
Deneyler için, ağırlıkları 200-250 g arasında değişen, yaklaşık üç aylık, 80 adet Wistar türü erkek ve dişi sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar, deney süresi boyunca her kafeste 3 tane olacak şekilde, su ve yem kısıtlaması olmaksızın tutulmuşlardır. Diyabetik hayvan modeli oluşturmak üzere, hayvanlara tek doz streptozotocin (STZ; 50 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi. STZ enjeksiyonundan bir hafta sonra hayvanların kan şeker düzeyleri ölçülerek, diyabetik olmayan hayvanlar deney dışı tutulmuşlardır. Kan şeker düzeyleri 300 mg/dl ve üzerinde olan hayvanlar diyabetik olarak kabul edilmiş ve iki gruba ayrılmışlardır. Diyabetli olan iki gruptan birincisine (D), dört hafta boyunca her gün gavaj yoluyla doğrudan mideye su verilirken, diğer gruba (D+Can) 5 mg/kg/gün dozunda aynı süre ve aynı yöntemle candesartan-cilexetil verilmiştir. Candesartan-cilexetil suda çözünmeyen bir bileşik olduğundan, tamamen eriyinceye kadar vorteks ile homojen bir süspansiyon haline getirilmiş ve sonra sıçanlara verilmiştir.

Kontrol grubu (K) hayvanlarına STZ taşıyıcısı olan sitrat (0,1 mol/l, pH=4,5 sitrat tamponu) enjeksiyonunu takip eden yedi günün ardından, her gün hayvan ağırlığına uygun olarak dört hafta boyunca mideye gavaj ile su verilmiş, ikinci gruba (K+Can) ise günde 5 mg/kg/gün olacak şekilde candesartan-cilexetil süspansiyon haline getirilerek yine aynı yolla, aynı süre boyunca uygulanmıştır.

Dört haftalık deney sürecini takip eden beşinci hafta içerisinde, kan şekeri düzeyleri ve vücut ağırlıkları tekrar ölçüldükten sonra sıçanlar kesilmişlerdir. Gruplardaki hayvanların bir kısmının kalpleri çıkarılarak papiler kası mikro makas ile hassas bir şekilde izole edildi ve bu kas AP ve kasılma kayıtları için kullanılmıştır. Diğer sıçanların kalplerinden enzimatik yoldan kardiyomiyosit izole edilerek, tek hücre deneyleri gerçekleştirilmiştir.

## 2.2. Aksiyon Potansiyellerinin ve Kasılma Yanıtlarının Kaydedilmesi

Sıçanlar pentobarbital sodyum ile uyutulup (30 mg/kg, i.p.) kalpleri hızlı bir şekilde çıkarıldıktan sonra, düşük- $\text{Ca}^{2+}$  - içeren (0,625 mM) Krebs solüsyonu (mM olarak): 119 NaCl; 4,8 KCl; 1,8  $\text{CaCl}_2$ ; 1,2  $\text{MgSO}_4$ ; 1,2  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 20  $\text{NaHCO}_3$  ve 10 glukoz (pH=7,4) içerisine konulmuştur. Aynı çözelti içerisinde kalbin sol ventrikül papiler kası izole edilerek organ banyosu içine yerleştirilmiş ve bir ucuna uyaran elektrodu batırıldıktan sonra, diğer ucu ince bir iplikle kuvvet transdüserine bağlanarak elektrofizyolojik kayıtlara hazır hale getirilmiştir. Doku 1,8 mM  $\text{CaCl}_2$  içeren ve sürekli oksijen karışımı (% 95  $\text{O}_2$  ve % 5  $\text{CO}_2$ ) ile gazlanan çözeltinin dolaştığı banyo içerisinde 30 dakika dinlenmeye bırakılmıştır.

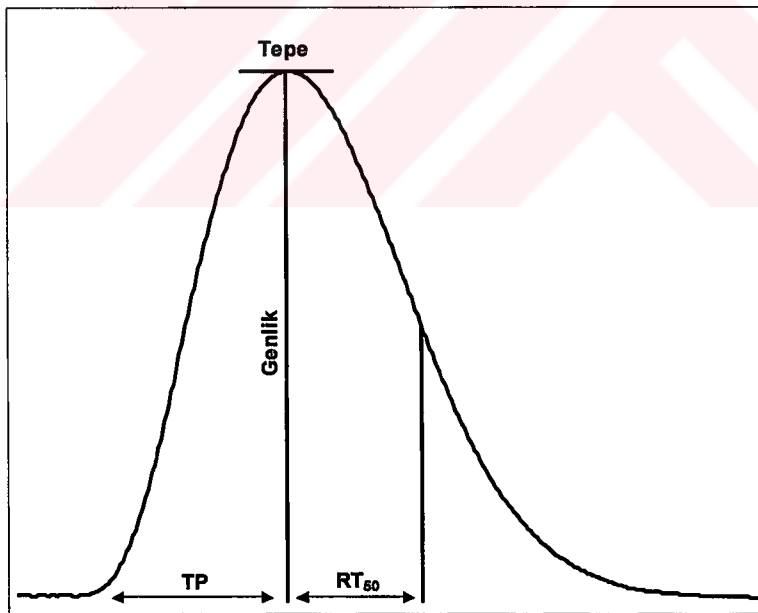


**Şekil 2.1. Sol ventrikül papiler kasından kaydedilen bir aksiyon potansiyeli eğrisi üzerinde ölçülen parametreler.** Kalın çizginin eğriyi kestiği nokta tepe değeri ve  $E_m$  dinlenim potansiyeli olmak üzere, çizgiden sağa doğru repolarizasyon evresinin maksimum değerinin %25, 50, 75 ve 90'ına düşmesi için geçen süreler gösterilmektedir.

AP ve kasılma kayıtlarında, 3 M KCl ile doldurulmuş ve ölçülen direnci 10-15 M $\Omega$ 'luk direnci olan filamanlı borosilikat cam elektrodlar (Clark Electromedical

Instruments GC150F-15) kullanılmıştır. Elektrodun çıkışı bir ön yükselticiden geçtikten sonra osiloskoba (Gould 20 MHz digital storage type1421) ve örnekleme hızı 10 kHz olan bir kart aracılığıyla bilgisayara aktarılmıştır. Kayıtların ortalaması alınarak AP'nin repolarizasyon fazının % 25, 50, 75 ve 90'ına inme süreleri (APD<sub>25</sub>, 50, 75, 90) belirlenmiştir. Papiller kasından kaydedilen intrasellüler AP'i üzerinden ölçülen yukarıdaki parametreler bir AP eğrisi üzerinde Şekil 2.1 de gösterilmiştir.

Daha sonra, kas gerilerek bir süre dinlendirilmiş ve 0,2 Hz lik uyarılar verilerek izometrik kasılma eğrileri kaydedilmiştir. Alınan kayıtların ortalaması alınmış ve yazılan bir bilgisayar uygulama programı ile maksimum gerim (Max), gerimin tepesine çıkış süresi (TP) ve gevşemenin % 50'sine iniş süresi (RT<sub>50</sub>) hesaplanmıştır. Papiller kasından elektriksel uyarı ile kaydedilen sarsı (kasılma+gevşeme) eğrisi üzerinden ölçülen yukarıdaki parametreler bir sarsı eğrisi üzerinde Şekil 2.2 de gösterilmiştir. Tüm deney 37 °C'lik sabit banyo sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 2.2. Sol ventrikül papiller kasından kaydedilen bir kasılma eğrisi üzerinde ölçülen parametreler.** Kasılma eğrisinin en yüksek değeri genlik, bazal seviyeden tepe değerine ulaşma süresi, TP; Tepe değerin % 50'sine düşmesi için geçen süre, RT<sub>50</sub> gösterilmektedir.

### 2.3. Kardiyak Miyositlerin İzolasyonu

Deney gruplarında bulunan hayvanların hafif anestezi altında (30 mg/kg sodyum pento barbital) kalpleri hızlı bir şekilde çıkarıldıktan sonra Langendorff sistemine bağlanmıştır. Daha önce başka araştırmacıların kullandıkları enzimatik yöntem takip edilerek (Ayaz ve ark., 2004), asılı kalpler önce içeriği (mM): 145 NaCl; 5 KCl; 1,2 MgSO<sub>4</sub>; 1,4 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,4 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5 HEPES; 10 glukoz olan ve pH 7,4 dengesinin sağlanması için % 5 CO<sub>2</sub>-% 95 O<sub>2</sub> ile gazlanan, kalsiyumsuz perfüzyon solüsyonu ile 5 dakika yıkanmıştır. Arkasından, kalbin üzerinden 30-35 dakika süresince aynı solüsyon içinde hazırlanmış kollajenaz (Roche, Collagenase A type) (1-1,2 mg/ml) geçirilip uygun kıvama ulaşıldığında, kalp küçük bir kabın içine alınmış ve makasla ince bir şekilde dilimlenmiştir. Daha sonra, ince bir filtreden geçirilerek hücreler bir tüpün içerisine alınmış ve birkaç yıkama işleminden geçirilmiştir. Ortamdaki Ca<sup>2+</sup> aşamalı olarak artırıldıktan ve hücreler 37 °C'de 1 saat kadar bekletildikten sonra akım kayıtlarına geçilmiştir. Ayrıca, hücrelerin bir kısmı hücre içi serbest Ca<sup>2+</sup> kayıtları için ayrı bir tüp içinde saklanarak 4 saat süreyle bekletilmiştir.

### 2.4. Potasyum Akımlarının Kaydedilmesi

Bütün akımlar voltaj kenetleme yönteminin tüm-hücre konfigürasyonunda alınmıştır. Bunun için, hücrenin GΩ düzeyinde bir direnç oluşturacak şekilde elektrod ucuna yapışması sağlandıktan sonra, 900 mV'luk bir puls uygulanarak hücre zarı kırılmıştır. Kenetlemeden 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 (Model RF-300; Biologic, Claix, France) voltaj kenetleme modunda 3 kHz'lik filtreden geçirilen potasyum akımları, Digidata 1200'ün 5 kHz'lik örnekleme hızında pClamp 8 yazılımı (Axon Instruments, Foster City CA, USA) ile kaydedilmiştir. Kayıt için 1-1.5 MΩ'luk elektrodlar kullanılırken, kenetleme sonrası giriş (access) direncinin 6 MΩ ve altında olmasına özen gösterilmiştir. Akım kayıtları için gerekli hücre dışı ortam kapiller borular (iç ve dış çapları 200 µm ile 1000 µm olan) kullanılarak ve

yerçekimi etkisi ile direk hücre üzerine uygulanmıştır (Ayaz ve ark., 2004). Bu akımlar için kullanılan çözeltiler banyo için (mM): 117 NaCl; 5,4 KCl; 1,8 CaCl<sub>2</sub>; 1,7 MgCl<sub>2</sub>; 10 Glukoz; 10 HEPES (pH=7,4), pipet için ise (mM): 120 KCl; 6,8 MgCl<sub>2</sub>; 5 Na<sub>2</sub>ATP; 5 Na-phosphocreatine; 0,4 Na<sub>2</sub>GTP; 11 EGTA; 4,7 CaCl<sub>2</sub>; 20 HEPES (pH=7,2) olacak şekilde hazırlanmıştır. Ayrıca, Ca<sup>2+</sup> akımlarını bloke etmek amacıyla kapiller içi ortama CdCl<sub>2</sub> (250 µM) eklenmiştir.

Akımların tepe değerinden 600 ms'lik pulsun son bölümündeki akım değerleri (I<sub>ss</sub>) çıkarılarak I<sub>0</sub> hesaplanmıştır. -120 mV'tan -40 mV kadar olan akımların tepe değerleri ölçülerek I<sub>K1</sub> elde edilmiştir. Daha sonra, her iki akım için ölçülen tepe değerleri hücreler arası büyüklük değişiminden kaynaklanabilecek sapmaları önlemek amacıyla hücre sığasına bölünerek akım yoğunluğu cinsinden değerlendirilmiştir (Shimoni ve ark., 1994; ; Shimoni, 1999; Shimoni, 2001; Ayaz ve ark., 2004).

Akımların aktivasyon değerleri her bir potansiyel değerinde kaydedilen akımın maksimum akıma oranlanması ile elde edilmiş ve Boltzmann denkleminde uydurulmuştur (Xu ve Rozanski, 1997; Rozanski ve Xu, 2002). V<sub>1/2</sub> yarı aktivasyon potansiyelinin değeri, V<sub>m</sub> zar potansiyeli ve *k* sigmoidal eğrinin eğim parametresi olmak üzere denklem aşağıdaki gibi yazılabilir.

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

Kanalların inaktivasyon kinetiğini incelemek için -80 mV'a kenetlenen membran 50 ms boyunca -60 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 bekleyip, +70 mV'luk ve 500 ms süreli ikinci bir puls uygulanmıştır. Arkasından 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.  $\Delta t=20$  ms olmak üzere aynı protokol 300 ms'ye kadar uygulanmış ve her adımda ölçülen akımın tepe değeri maksimum akım değerine oranlanıp 100 rakamı ile çarpıldıktan sonra zamana göre % reaktivasyon hesaplanmış ve bir üssel fonksiyona uydurulmuştur.

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

Kanalların kinetik analizleri de yapılarak Boltzman denklemlerinden aktivasyon ve inaktivasyon, üssel fonksiyondan ise reaktivasyon parametreleri elde edilerek gruplar arasındaki farklar incelenmiştir.

## 2.5. L-tipi $Ca^{2+}$ Akımlarının Kaydedilmesi

Bu çalışmada L-tipi  $Ca^{2+}$  kanal akımları ( $I_{CaL}$ ) ölçülmüştür. Bu akımlar tüm hücre voltaj kenetleme konfigürasyonunda 1,5-2,0 M $\Omega$ 'luk elektrotlar kullanılarak alınmıştır. Ölçümler için kullanılan pipet solüsyonu (mM): 110 Cs-aspartat; 20 CsCl; 1,0 MgCl<sub>2</sub>; 5,0 fosfokreatin-Na<sub>2</sub>; 5 ATP-Na<sub>2</sub>; 10 EGTA ve 5 HEPES (pH= 7,4). Kayıt için, hücreler -80 mV düzeyinde kenetlenerek eğimli bir voltaj uygulaması ile zar potansiyeli -45 mV'a kenetlenmiş, bu seviyede bir süre beklenerek sodyum ( $Na^+$ ) akımları inaktif hale getirilmiştir. Sonra -50 mV'tan 10 mV'luk artışlarla +60 mV'a 300 ms'lik depolarize edici pulslar uygulanarak 12 farklı voltaj seviyesinde kayıtlar alınmış ve bilgisayara kaydedilerek Clampfit 8.0 programı ile analiz edilmişlerdir. Tepe değerleri ölçülüp 200 ms'nin sonundaki kuyruk akımlarından çıkarılmıştır. Her potansiyel için elde edilen akım değeri ölçüm yapılan hücrenin ölçülen sıgasına bölünerek değerlendirilmiş ve tüm akım değerleri akım yoğunluğunun voltaja göre değişimi olarak verilmiştir.

Kanalların inaktivasyon durumunu gözlemek için  $-80$  mV ile  $+20$  mV arasında  $10$  mV adımlarla  $200$  ms süreli prepuls uyguladıktan sonra  $3$  ms'lik bir süre için tekrar  $-80$  mV seviyesine dönülüp, arkasından zar her defasında yine  $200$  ms süreyle  $0$  mV'a kenetlenmiştir. Reaktivasyon ise;  $-80$  mV'taki zar potansiyeli  $200$  ms süreyle  $0$  mV'a kenetlendikten sonra, başlangıçtaki duruma dönülerek  $50$  ms beklenmiş ve aynı puls tekrar edilerek kaydedilmiştir. Pulslar arasındaki süre olan  $\Delta t=50$  ms olmak üzere aynı protokol  $500$  ms'ye kadar uygulanmıştır.

Bu kanalların kinetik analizleri ve parametrelerin elde edilmesi yine yukarıdaki denklemlere göre yapılmıştır (Xu ve Rozanski, 1997; Rozanski ve Xu, 2002).

## 2.6. Hücre İçi Serbest $Ca^{2+}$ Derişimi Ölçümü

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

ile temsil edilmiştir.  $[Ca^{2+}]_i$  sinyallerinin bazal değerden çıkarılarak ölçülen maksimum değeri ( $\Delta F_{340/380}$ ), tepeye çıkış süresi (TP) ve maksimum değer % 50'sine iniş süresi ( $DT_{50}$ ) ölçülerek karşılaştırılmıştır.

Kronik deney gruplarının ölçümlerine ek olarak, diyabetli ve kontrol gruplarına ait kardiyomiyositlerin bir kısmı protein kinaz C inhibitörü olan bisindolylmaleimide I (BIM) ile 4 saat süre ile inkübe edilerek (*in vitro* deneyler) geçici  $Ca^{2+}$  değişimleri de kaydedilmiştir.

Kafein deneylerinde ventrikül hücreleri 25-30 V'luk pulslar ile 0,2 Hz frekansında 120 s süreyle uyarılarak depoların dolması sağlandıktan sonra, uyarı kesilerek 30 s beklenmiştir. Ardından, banyo ortamına mikropipet yardımıyla dozu 10 mM olacak şekilde kafein eklenmiştir. Sinyal hızlı sitozolik  $Ca^{2+}$  artışı takip eden iniş süreci bitinceye (başlangıç düzeyine dönünceye) kadar kaydedilmiştir. Daha sonra bu sinyalden banyonun hücre bulunmayan bir bölgesinden kaydedilen floresan şiddetleri çıkarılmış, geriye kalan sinyalin de tepe değeri ölçülerek "kafein-uyarımlı  $Ca^{2+}$  artışı" olarak değerlendirilmiştir.

## 2.7. İstatistiksel Analizler

Tüm deney sonuçları ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. Akımların kinetik analiz (aktivasyon, inaktivasyon, reaktivasyon) parametrelerinin gruplar arasındaki değişimini değerlendirmek için davranış denklemlerinin bir bütün olarak karşılaştırılmasını sağlayan F-testi kullanılmıştır. Diğer bütün parametreler iki-yönlü t-testi ile karşılaştırılmıştır.

## 2.8. Kullanılan Kimyasallar

NaCl, KCl,  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $KH_2PO_4$ , HEPES, glucose, Cs-aspartat, CsCl,  $MgCl_2$ , fosfokreatin- $Na_2$ , ATP- $Na_2$ , EGTA,  $Na_2GTP$ ,  $CdCl_2$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $NaH_2PO_4$  ve BIM



Sigma (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany)'dan satın alınmıştır. Collagenase A Roche firmasından (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), FURA-2AM ise Molecular Probes (Molecular Probes, Oregon, USA)'tan satın alınmıştır. Candesartan-cilexetil AstraZeneca (Mölndal, Sweden) firması tarafından hediye edilmiştir.



### 3. BULGULAR

#### 3.1. Hayvanların Genel Durumları

Deneyleer ortalama 200-250 g ağırlıklarındaki yetişkin (2,5-3 aylık) hayvanlar ile gerçekleştirilmiştir. Tablo 1'de görüldüğü gibi başlangıçta tüm deney gruplarının ağırlıkları ve kan şekeri düzeyleri birbirlerine yakın düzeyde iken, birinci haftadan itibaren diyabetli grupların kilo kazanımında bir duraklama olduğu ve kan şekeri düzeylerinin kontrol grubuna göre 3-4 kat arttığı gözlenmiştir. Bunun yanında, candesartan-cilexetil verilen diyabetli grubun kilo kazanımında ve kan şekeri düzeyinde bir düzelme olmadığı gözlenmiştir. Deney sürecinin sonunda diyabet olan iki grupta da ağırlıkların kontrole göre anlamlı derecede düşük olduğu ve yüksek kan şekeri seviyelerinin korunduğu görülmüştür.

Kontrol ve Candesartan-cilexetil verilen kontrol gruplarında deney süresi boyunca ağırlıklarda düzenli ve olağan artışın gerçekleştiği, kan şekeri değerlerinin ise değişmediği görülmektedir (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1.** Hayvanların genel parametreleri.

	Vücut Ağırlığı (g)		Kan Şekeri (mg/dl)	
	Başlangıç	Son	Başlangıç	Son
<b>K (n=22)</b>	209,2±6,6	234,1±7,8	103,5±1,4	101,4±2,1
<b>K+Can (n=22)</b>	209,8±4,3	243,8±6,9	106,3±1,5	106,7±1,7
<b>D (n=19)</b>	220,2±4,8	196,1±9,6*	416,7±14,7*	410,1±7,7*
<b>D+Can (n=24)</b>	215,6±5,0	193,3±7,1*	415,1±11,2*	402,3±13,9*

Yukarıdaki kısaltmalar kontrol (K), candesartan-cilexetil verilmiş kontrol (K+Can) Diyabet (D) ve candesartan-cilexetil verilmiş diyabet (D+Can) olarak kullanılmıştır. Grupların deney sürecinin başlangıcında ve sonunda ölçülen ağırlıkları (g) ve kan şekeri düzeyleri (mg/dl). Değerler ortalama±SEM olarak verilmiştir. n= hayvan sayısı; \*p<0,05 vs K grubu.

### 3.2. Aksiyon Potansiyeli ile İlgili Parametreler

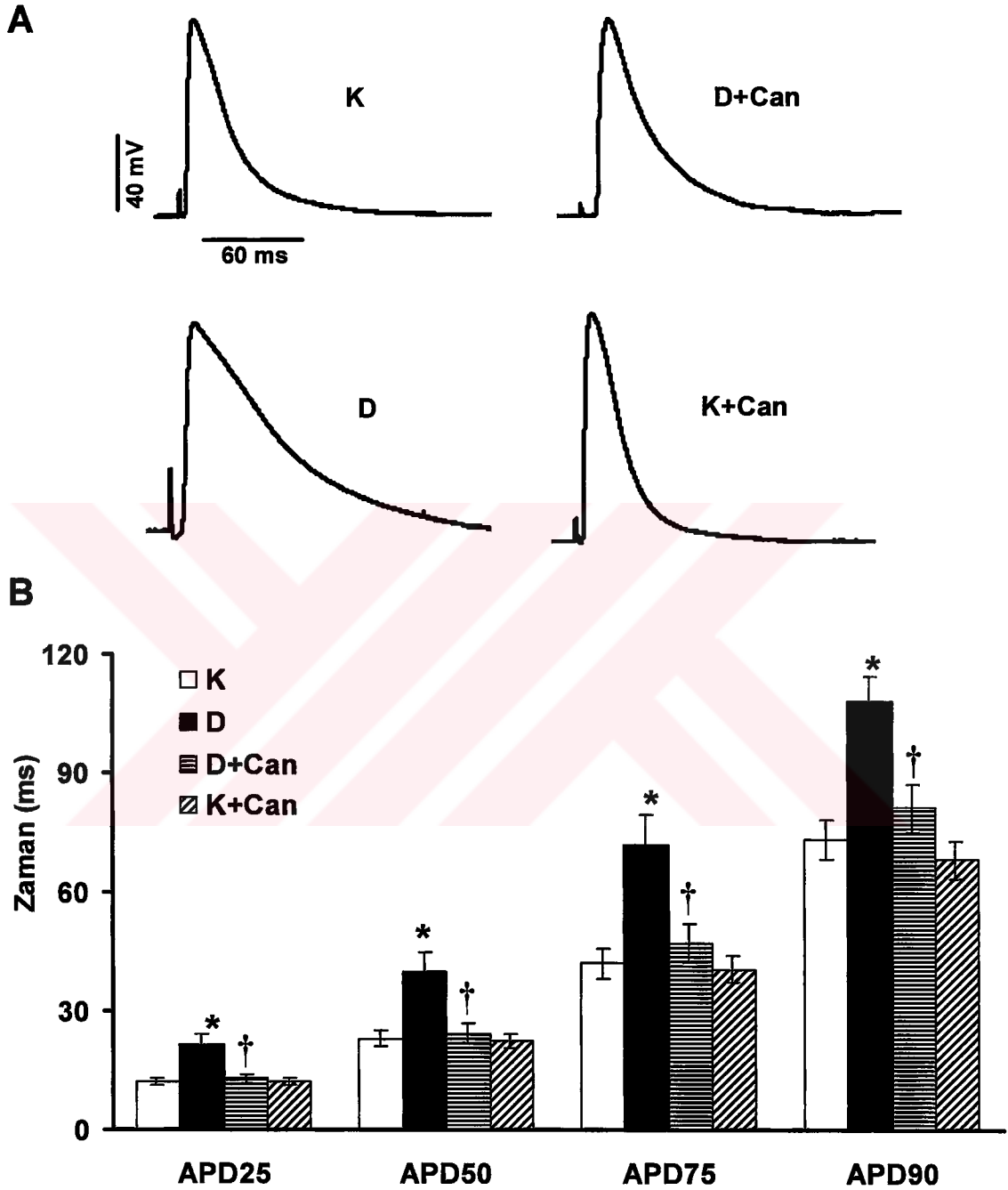
AP ile ilgili ölçülen parametreler; dinlenme zar potansiyeli ( $E_m$ ), AP tepe değeri (Maks), ve repolarizasyonun dört evresine ulaşma süreleridir. Bu süreler AP'nin tepe değerinden repolarizasyon fazının % 25, 50, 75 ve 90'ına ulaşma zamanı olarak seçilmiş ve  $APD_{25}$ ,  $APD_{50}$ ,  $APD_{75}$  ve  $APD_{90}$  olarak temsil edilmişlerdir. Kayıtların analizinden diyabetli grubun repolarizasyon sürelerinin ( $21,5 \pm 2,5$  ms;  $40,1 \pm 4,6$  ms;  $71,8 \pm 7,7$  ms;  $108,0 \pm 6,3$  ms), kontrol değerlerine ( $12,1 \pm 1,0$  ms;  $22,9 \pm 2,1$  ms;  $42,0 \pm 3,8$  ms;  $73,0 \pm 4,9$  ms) göre anlamlı düzeyde uzun olduğu görülmüştür (Tablo 3.2, Şekil 3.1).

Bunun yanında, dört haftalık candesartan-cilexetil uygulamasının diyabetli grubun uzamış olan repolarizasyon süresini kısalttığı ( $12,8 \pm 1,2$  ms;  $24,3 \pm 2,4$  ms;  $47,0 \pm 4,9$  ms;  $81,0 \pm 6,0$  ms) ve bu değişimin istatistiksel anlamlılık taşıdığı görülmüştür (Tablo 3.2, Şekil 3.1). Şekil 3.1A'daki gruplara ait AP örneklerinde ve parametrelerin ortalama değerlerini gösteren histogramda görüldüğü gibi candesartan-cilexetil uygulaması diyabetin yol açtığı AP bozukluklarını önemli ölçüde ortadan kaldırmaktadır. Repolarizasyon fazının ölçülen dört noktasında da diyabetin süreyi uzattığı, buna karşılık candesartan-cilexetil uygulamasının her noktada bu değerleri kontrol seviyesine yaklaştırdığı görülmüştür. Bununla birlikte, dört haftalık candesartan-cilexetil uygulaması kontrol grubunun papiller kasının APD değerlerini ( $12,0 \pm 0,9$  ms;  $22,3 \pm 1,7$  ms;  $40,5 \pm 3,3$  ms;  $67,9 \pm 4,8$  ms) değiştirmemiştir.

**Tablo 3.2.** Hayvanların papiler kas aksiyon potansiyeli parametreleri.

	<b>Em (mV)</b>	<b>Maks. (mV)</b>	<b>APD<sub>25</sub> (ms)</b>	<b>APD<sub>50</sub> (ms)</b>	<b>APD<sub>75</sub> (ms)</b>	<b>APD<sub>90</sub> (ms)</b>
<b>K (n=9)</b>	-84,8±0,8	7,4±0,8	12,1±1,0	22,9±2,1	42,0±3,8	73,0±4,9
<b>K + Can (n=10)</b>	-83,7±1,0	8,1±0,8	12,0±0,9	22,3±1,7	40,5±3,3	67,9±4,8
<b>D (n=7)</b>	-80,7±0,7	4,8±0,9	21,5±2,5*	40,1±4,6*	71,8±7,7*	108,0±6,3*
<b>D+Can (n=9)</b>	-80,5±0,5	7,2±1,1	12,8±1,2 <sup>†</sup>	24,3±2,4 <sup>†</sup>	47,0±4,9 <sup>†</sup>	81,0±6,0 <sup>†</sup>

Gruplara ait kısaltmalar Tablo 3.1'deki gibidir. Gruplara ait sol ventrikül papiler kasından kaydedilen aksiyon potansiyellerinin ortalama E<sub>m</sub>, Maks., APD<sub>25</sub>, APD<sub>50</sub>, APD<sub>75</sub> ve APD<sub>90</sub> değerleri hesaplanıp, ortalaması±SEM olarak verilmişlerdir. n= Hayvan sayısı; \*p<0,05 vs K grubu, <sup>†</sup>p<0,05 vs D grubu.



**Şekil 3.1. Örnek aksiyon potansiyeli kayıtları ve ortalama APD değerleri.** Kontrol (K), diyabet (D) ve 4 hafta boyunca günde 5 mg/kg candesartan-cilexetil verilmiş diyabet (D+Can) ve kontrol (K+Can) grupları için örnek aksiyon potansiyelleri ve ortalama değerler için çizdirilmiş histogram. Örnek sayısı dört grup için sırasıyla n=9, 10, 7, 9'dur. Değerler ortalama±SEM olarak verilmiştir. \*p<0,05 vs K grubu, †p<0,05 vs D grubu.

### 3.3. Potasyum ve Kalsiyum Akımları ile İlgili Bulgular

AP'nin şekli hücre zarından geçen iyon akımlarının miktarına ve bunların zamansal değişimlerine bağlıdır. Bu nedenle, papiler kas AP'de oluşan değişikliklerin altında yatan iyonik mekanizmaları açığa çıkarmak amacıyla izole kardiyomiyositlerden  $K^+$  ve  $I_{CaL}$  akımları kaydedildi.

#### 3.3.1. Diyabetin ve Candesertan Uygulamasının $K^+$ Akımları Üzerine Etkileri

Aksiyon potansiyelinin repolarizasyon evresine şeklini veren en önemli akımların başında  $K^+$  akımları gelmektedir. Bu nedenle çalışmamızda üç tip  $K^+$  akımı da ( $I_{to}$ ,  $I_{ss}$  ve  $I_{K1}$ ) ölçülmüş, bu akımların maksimum değerleri hücre kapasitanslarına oranlanarak akım değerleri akım yoğunluğu (pA/pF) cinsinden verilmiştir. Gruplara ait ortalama akım yoğunluklarının zar potansiyeline göre değişim eğrileri ve örnek akım kayıtları Şekil 3.2'de görülmektedir.

Grupların ventrikül hücrelerine ait ortalama kapasitans değerleri karşılaştırıldığında, ne diyabetin ne de candesertan-cilexetil uygulamasının kapasitans değerlerini etkilemediği (K:  $130,0 \pm 5,8$  pF; D:  $123,3 \pm 11,2$  pF; D+Can:  $120,9 \pm 6,1$  pF) gözlenmiştir.

Akım kayıtlarının değerlendirilmesinden D grubunun  $I_{to}$  tepe değerinin, K grubu değerlerinden farklı olduğu ve diyabetin bu akımı baskıladığı gözlenmiştir (K:  $14,1 \pm 1,7$  pA/pF; D:  $8,8 \pm 1,4$  pA/pF; D+Can:  $13,0 \pm 0,4$  pA/pF). Bununla birlikte, D+Can grubunda anlamlı bir düzelmenin gerçekleştiği ve akım yoğunluğu değerlerinin kontrol seviyelerine yakın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.2 ve Tablo 3.3).

Kanal kinetikleri incelendiğinde ise; D grubu kardiyomiyositlerinde  $I_{to}$ 'nun aktivasyon eğrisinin sola doğru kaydığı ve eğiminin azaldığı gözlenmiştir. Bunun sonucunda yarı aktivasyon potansiyeli ( $V_{1/2}$ ) ve sigmoidal eğrinin eğim ( $k$ ) değerleri D grubunda ( $17,1 \pm 0,1$  mV;  $14,9 \pm 0,1$ ), K grubuna ( $23,8 \pm 0,1$  mV;  $16,7 \pm 0,1$ ) göre

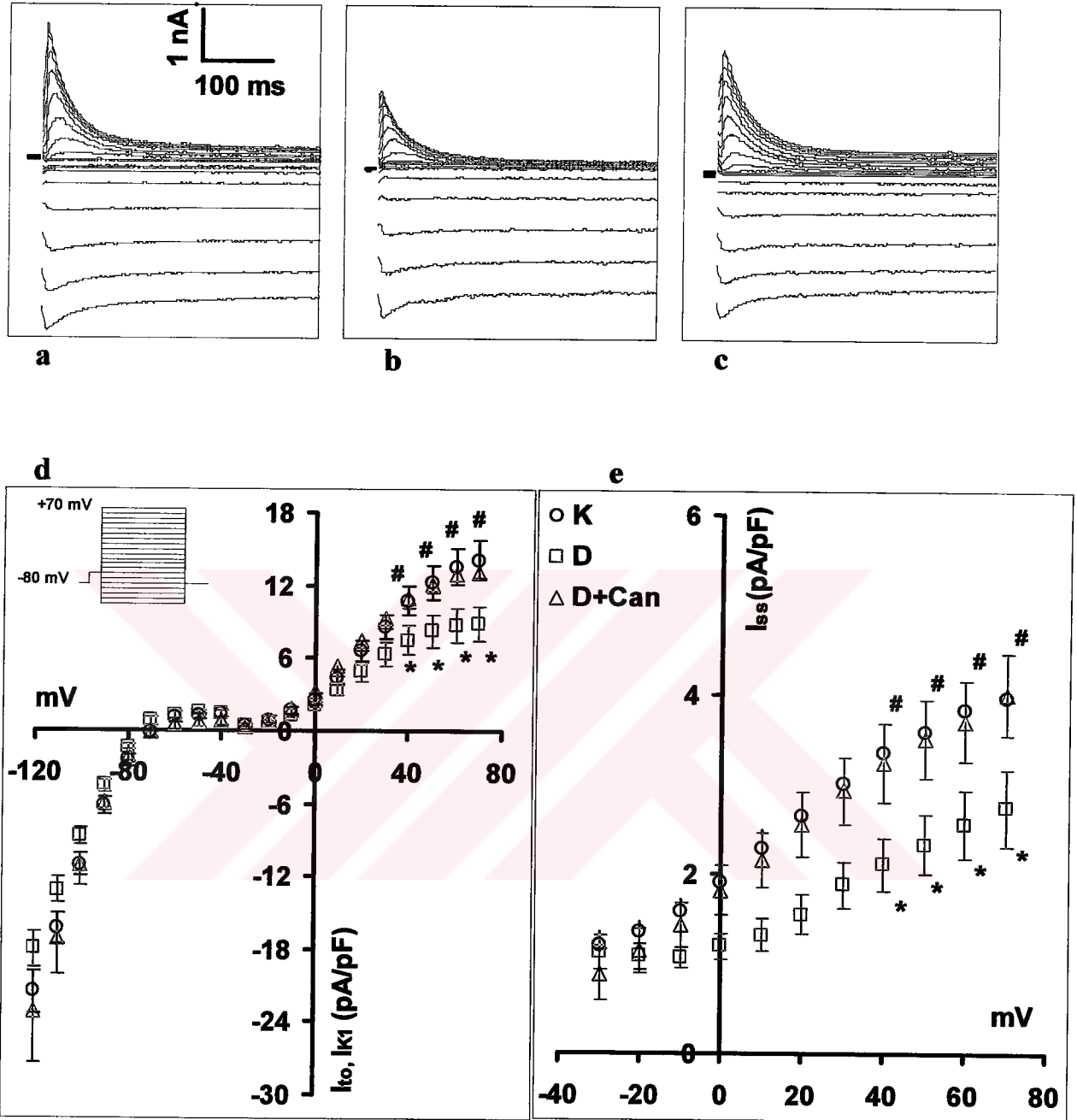
azalmaktadır (Şekil 3.3 ve Tablo 3.3). Buna karşılık, diyabetli sıçanlara candesartan-cilexetil verilmesi (D+Can) hem  $V_{1/2}$  değerini ( $17,9 \pm 0,2$  mV), hem de  $k$  ( $15,5 \pm 0,2$ ) değerini anlamlı derecede değiştirmemiştir (Şekil 3.3 ve Tablo 3.3).

Bunun yanında,  $I_{to}$ 'nun inaktivasyon eğrisinde de sola doğru kayma olurken, eğimi de daha yatık bir şekil almaktadır. Başka bir deyişle, D grubu akımlarının inaktivasyon  $V_{1/2}$  ve  $k$  değerlerinde ( $-27,6 \pm 0,1$  mV;  $-7,1 \pm 0,1$ ), K grubu ( $-23,0 \pm 0,1$  mV;  $-5,6 \pm 0,1$ ) akımlarına göre azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3 ve Tablo 3.3). Ayrıca, 4 haftalık candesartan-cilexetil uygulaması sonunda diyabetli sıçanların ventrikül hücrelerinin inaktivasyon ( $-20,7 \pm 0,2$  mV;  $-5,2 \pm 0,1$ ) parametreleri olan  $V_{1/2}$  ve  $k$  değerlerinin düzeldiği ve K grubu değerlerine yaklaştığı gözlenmiştir (Şekil 3.3 ve Tablo 3.3).

Reaktivasyon kinetiklerine bakıldığında, akımın iki puls arasındaki  $\Delta t$  süresine bağlı bir değişim izlediği ve bu değişimin üssel bir fonksiyona uyduğu gözlenmiştir. Yapılan analizlerden kanalın reaktivasyon kinetiklerinin K, D ve D+Can grupları arasında değişmediği görülmüştür (Şekil 3.3).

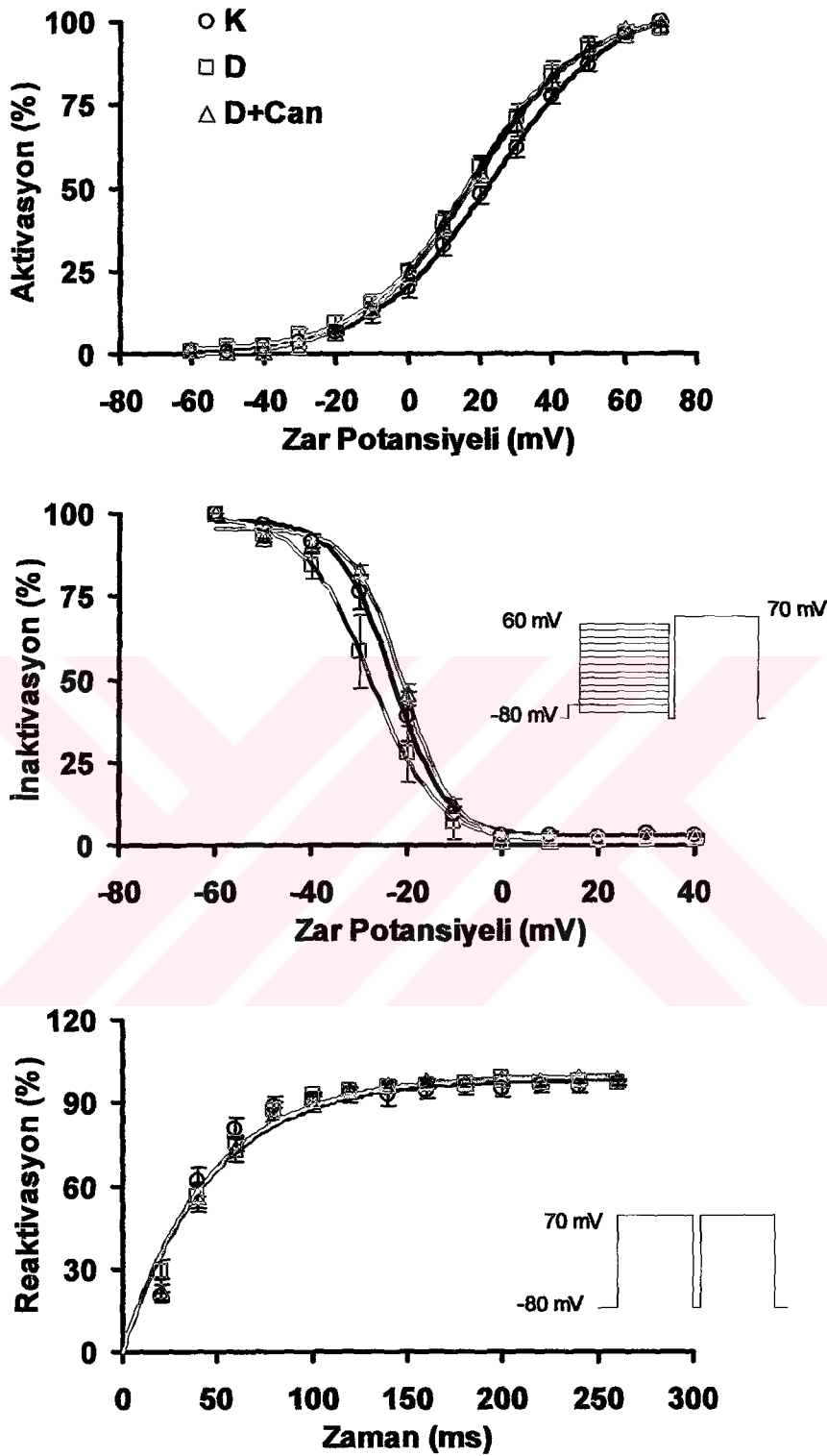
Diyabet, kontrol grubu değerleriyle karşılaştırıldığında  $I_{ss}$  akımlarının yoğunluklarında da anlamlı bir azalmaya neden olmaktadır (K:  $4,0 \pm 0,3$  pA/pF; D:  $2,7 \pm 0,4$  pA/pF). Fakat, 4 haftalık candesartan-cilexetil uygulaması (5 mg/kg/gün) diyabetli kardiyomiyositlerde azalmış olan ortalama  $I_{ss}$  değerlerini anlamlı derecede düzeltmektedir (D:  $2,7 \pm 0,4$  pA/pF; D+Can:  $4,0 \pm 0,5$  pA/pF) (Şekil 3.2).

Bu akımlara ek olarak,  $I_{K1}$  akımları da değerlendirilmiş ve akım yoğunluklarının K grubu kardiyomiyositlerine göre D grubunda anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (K:  $21,6 \pm 1,8$  pA/pF; D:  $18,1 \pm 1,5$  pA/pF; D+Can:  $23,2 \pm 4,3$  pA/pF). Bunun yanında, diyabetli sıçanlara candesartan-cilexetil uygulamasının da  $I_{K1}$  akım yoğunluklarında, herhangi bir değişikliğe yol açmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.2).



**Şekil 3.2.** Gruplara ait örnek potasyum akımları ve akım yoğunluğu-zar potansiyeli değişim eğrileri. a, Kontrol; b, Diyabet; c, Candesartan-cilexetil verilmiş diyabet gruplarını göstermektedir. Akımlar  $-80$  mV'tan  $500$  ms süreli pulslar uygulanarak elde edilmiştir.  $I_{K1}$  mutlak tepe değerlerinden (d);  $I_{ss}$  pulsun son  $20$  ms'lik kuyruk kesiminden (e);  $I_{to}$  ise  $-40$  ile  $70$  mV arasındaki akımların tepe değerlerinden  $I_{ss}$  çıkarılarak hesaplanmıştır (d). Değerler ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. \* $p < 0,05$  vs K grubu, # $p < 0,05$  vs D grubu.





**Şekil 3.3. Gruplar için  $I_0$  akımlarının kinetik analizleri.** Gruplardan elde edilen ortalama de-ğerler ve Boltzman denklemlerinin uygulanması ile çizdirilmiş aktivasyon ( $I/I_{max} = [1 + \exp((V_{1/2} - V_m)/k)]^{-1}$ ) ve inaktivasyon ( $I/I_{max} = [1 + \exp((V_m - V_{1/2})/k)]^{-1}$ ) eğrileri.  $V_{1/2}$ , aktivasyon veya inaktivasyon'un %50 değerine ulaştığı potansiyel ve  $k$  eğim parametresidir. Reaktivasyon değerlerine ise,  $I/I_{max} = [1 - \exp(-t/\tau)]$  üssel fonksiyon denklemi uydurulmuştur. Değerler ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir.

**Tablo 3.3.** Kardiyomiyositlerden kaydedilen  $I_{to}$  akım yoğunluğu değerleri ve kinetik parametreleri.

	Geçici Dışarı Doğru Potasyum Akımı ( $I_{to}$ )				
	Maks. akım (pA/pF)	$V_{1/2}$ (inakt) (mV)	$k$ (inakt)	$V_{1/2}$ (akt) (mV)	$k$ (akt)
<b>K</b>	14,1±1,7 (N=7)	-23,0±0,1 (N=7)	-5,6±0,1 (N=7)	23,8±0,1 (N=9)	16,7±0,1 (N=9)
<b>D</b>	8,8±1,4* (N=7)	-27,6±0,1* (N=7)	-7,1±0,1* (N=7)	17,1±0,1* (N=7)	14,9±0,1* (N=7)
<b>D+Can</b>	13,0±0,4 <sup>†</sup> (N=7)	-20,7±0,2 <sup>†</sup> (N=8)	-5,2±0,1 <sup>†</sup> (N=8)	17,9±0,2 (N=7)	15,5±0,2 (N=7)

Gruplara ait kısaltmalar Tablo 3.1'deki gibidir. Gruplara ait ventrikül hücrelerinden kaydedilen ortalama akım yoğunlukları, deneysel verilere Boltzman denklemlerinin uygulanmasıyla elde edilen  $V_{1/2}$  (yarı-aktivasyon veya inaktivasyon potansiyeli) ve  $k$  (eğim) parametreleri. Değerler, ortalama±SEM olarak verilmişlerdir. N= Hücre sayısı; \* $p<0,05$  vs K grubu, <sup>†</sup> $p<0,05$  vs D grubu.

### 3.3.2. L-tipi $Ca^{2+}$ Akımları

L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalları AP'nin şeklini etkilemenin yanında, hücre içi  $Ca^{2+}$  homeostazında da önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle, kontrol ve diyabetli sıçan ventrikül miyositlerinden kaydedilen  $Ca^{2+}$  akımlarının yoğunlukları ölçüldü ve kinetik analizleri yapıldı. Bu akımların değerlendirilmesinden elde edilen ortalama akım yoğunluğunun zar potansiyeline göre değişim eğrileri ve gruplara ait örnek akım kayıtları Şekil 3.4'de görülmektedir.

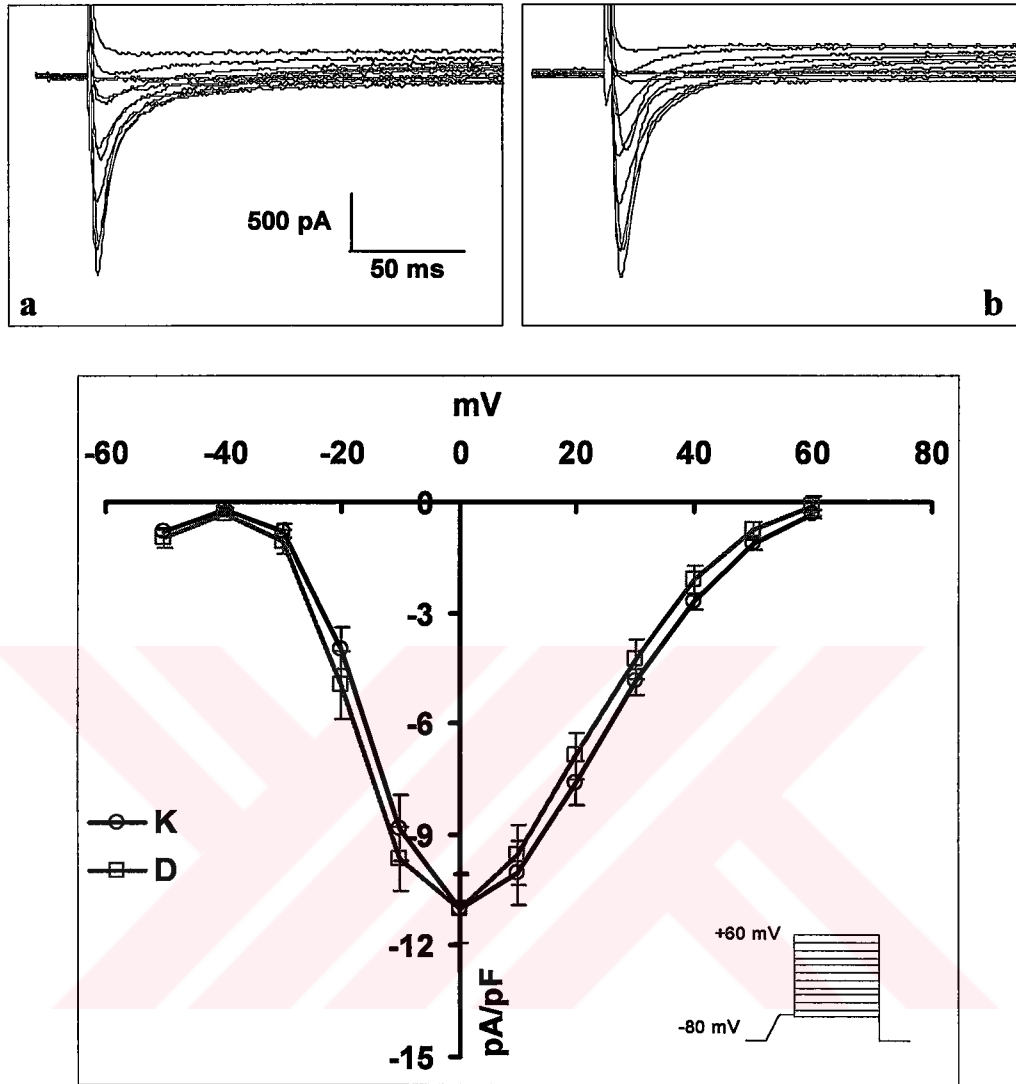
Sonuçlara bakıldığında, K ve D gruplarının akım yoğunlukları (10,99±0,94 pA/pF; 11,01±0,92 pA/pF) arasında bir fark olmadığı, dolayısıyla diyabetin kardiyak  $I_{CaL}$

akımlarını etkilemediği görülmektedir. Benzer şekilde, K ve D gruplarının  $I_{CaL}$  aktivasyon ve inaktivasyon kinetiklerinde de bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 3.5 ve Tablo 3.4). Diyabetli grubun inaktivasyon  $V_{1/2}$  ve  $k$  değerleri ( $-31,0 \pm 1,3$  mV;  $-7,5 \pm 1,2$ ) kontrol kardiyomiyositlerinin ortalama değerlerinden ( $-33,3 \pm 0,5$  mV;  $-7,1 \pm 0,4$ ) istatistiksel olarak farklı bulunamadı. Bunun yanında aktivasyon  $V_{1/2}$  ve  $k$  değerleri de diyabetli ( $-18,7 \pm 0,9$  mV;  $4,3 \pm 0,9$ ) ve kontrol ( $-16,5 \pm 1,0$  mV;  $4,7 \pm 0,8$ ) kardiyomiyositleri arasında anlamlı düzeyde değişmemektedir (Şekil 3.5 ve Tablo 3.4).

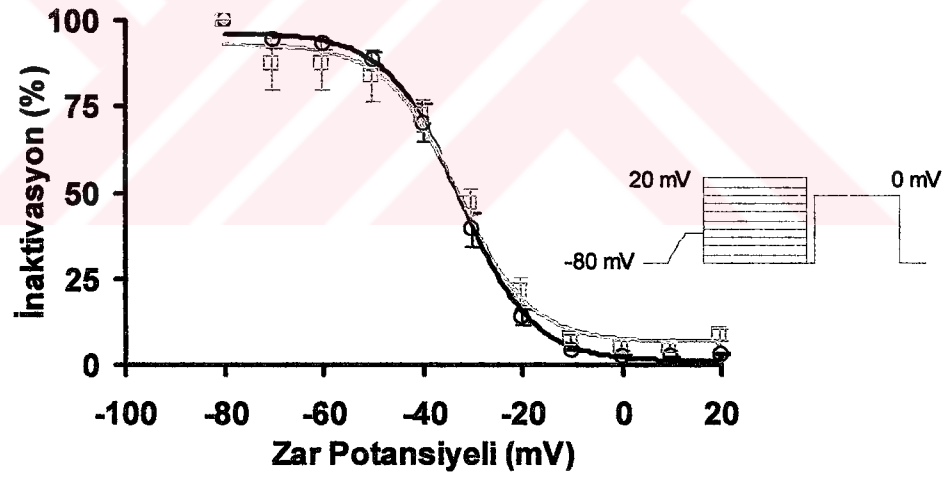
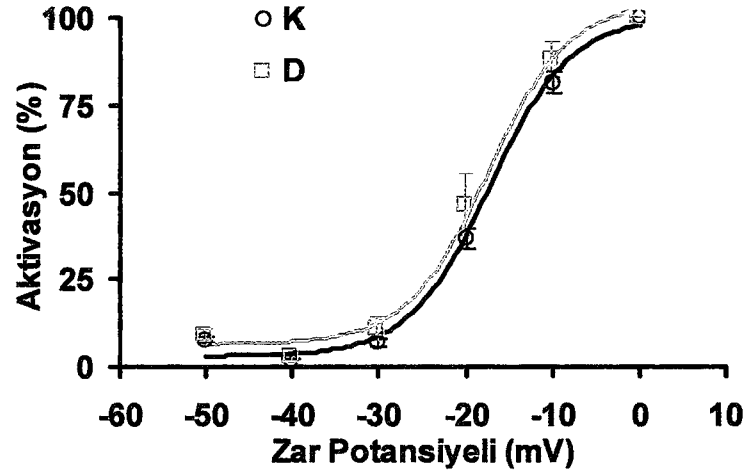
**Tablo 3.4.** Kardiyomiyositlerden kaydedilen  $I_{CaL}$  akımlarının yoğunluğu ve kinetik parametrelerinin değerleri.

	<b>L-tipi Kalsiyum Akımı (<math>I_{CaL}</math>)</b>				
	<b>Maks. akım (pA/pF)</b>	<b><math>V_{1/2}</math> (inakt) (mV)</b>	<b><math>k</math> (inakt)</b>	<b><math>V_{1/2}</math> (akt) (mV)</b>	<b><math>k</math> (akt)</b>
<b>K</b>	10,99±0,94 (N=10)	-33,3±0,5 (N=9)	-7,1±0,4 (N=9)	-16,5±1,0 (N=9)	4,7±0,8 (N=9)
<b>D</b>	11,01±0,92 (N=5)	-31,0±1,3 (N=5)	-7,5±1,2 (N=5)	-18,7±0,9 (N=5)	4,3±0,9 (N=5)

Gruplara ait kısaltmalar Tablo 3.1'deki gibidir. Gruplara ait ventrikül hücrelerinden kaydedilen ortalama akım yoğunlukları, deneysel verilere Boltzman denklemlerinin uygulanmasıyla elde edilen  $V_{1/2}$  (yarı-aktivasyon veya inaktivasyon potansiyeli) ve  $k$  (eğim) parametreleri. Değerler, ortalama±SEM olarak verilmişlerdir. N= Hücre sayısı; \*p<0,05 vs K grubu.



**Şekil 3.4. L-tipi kalsiyum kanal akımı.** Üstte, K ve D gruplarına ait örnek  $I_{CaL}$  kayıtları (a, b); Alttta, ve zar potansiyeline göre ölçülen akım yoğunluklarının ortalamasından elde edilen değerlerin değişimini gösteren grafik ve akımın kayıt protokolü. Değerler ortalama  $\pm$  SEM ile temsil edilmiştir.



**Şekil 3.5. Boltzman denkleminin uydurulması ile elde edilen aktivasyon ve inaktivasyon eğrileri.** Aktivasyon değerleri her potansiyel değerindeki akım genliğinin maksimum akım genliğine oranlanması ile elde edilmiştir. İnaktivasyon akım değerleri ise alttaki grafikte gösterilen protokole göre kaydedilmiştir. Değerler ortalama  $\pm$  SEM ile temsil edilmiştir.

### 3.4. Kasılma ile İlgili Parametreler

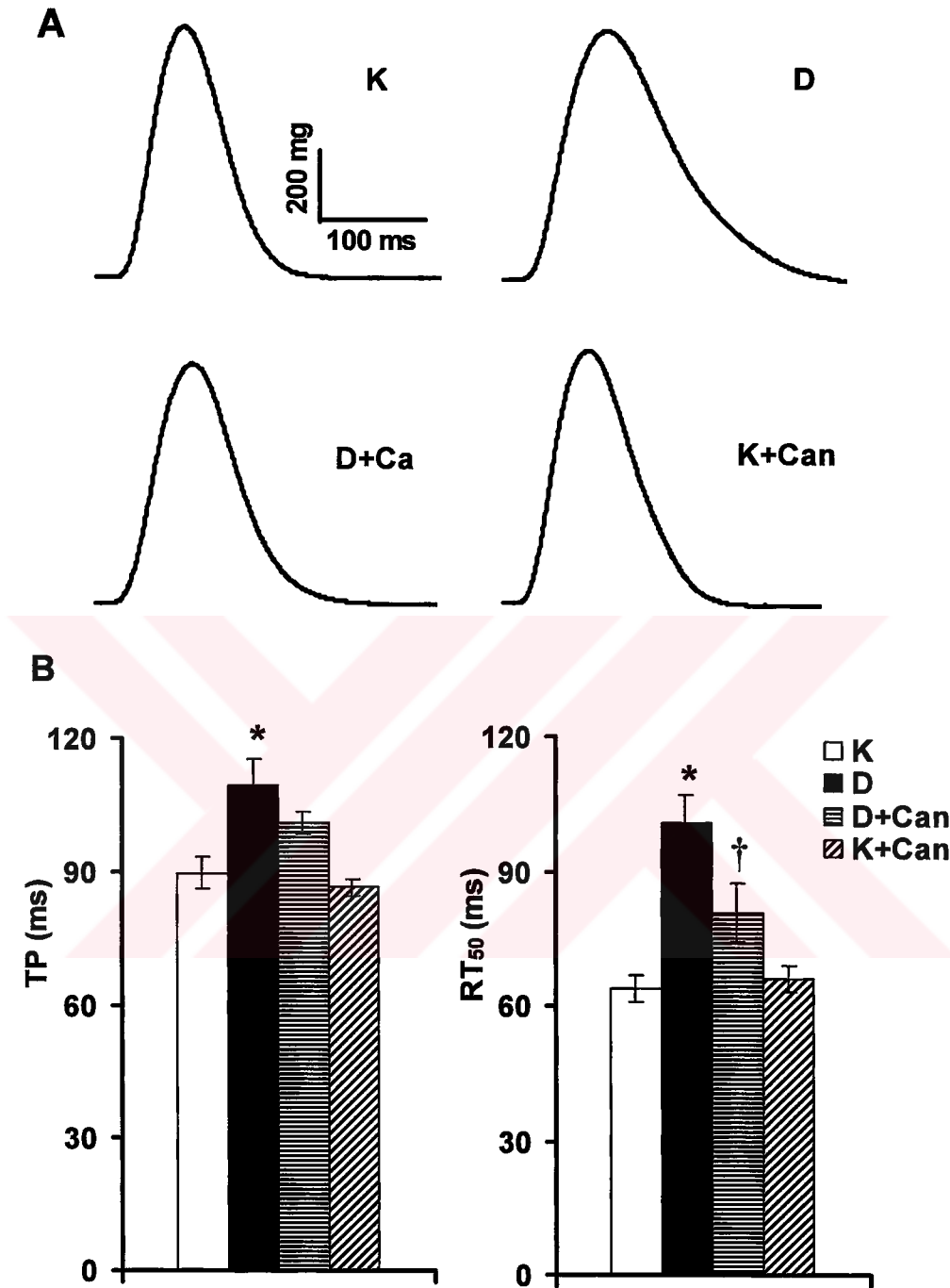
Diyabetin sıçan kalbinin elektriksel aktivitesinde yol açtığı değişikliklerin fonksiyon bozukluklarına kadar uzayıp uzamadığının belirlenmesi de büyük önem taşıdığından kasılma cevaplarına da baktık. Kalbin mekanik aktivitesine bakıldığında, diyabetin papiler kasın kasılma parametreleri olan TP ve RT<sub>50</sub> değerlerini (109,36 ± 5,95 ms; 100,86 ± 5,99 ms), kontrol değerlerine (89,58 ± 3,56 ms; 63,92 ± 2,90 ms) göre uzattığı gözlenmiştir. 4 haftalık candesartan-cilexetil tedavisinin uzamış olan RT<sub>50</sub>'yi anlamlı seviyede düzelttiği (80,75 ± 6,33 ms), ancak TP değerini de kısaltmasına rağmen (100,92 ± 2,68 ms), bu düzelmenin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı görülmüştür (Tablo 3.5 ve Şekil 3.6).

Kontrol hayvanlarına candesartan-cilexetil verilmesi kasılma parametrelerini etkilememektedir. Bunun yanında, grupların maksimum kasılma kuvvetlerinin ortalama değerinde anlamlı bir fark görülmemiştir (Tablo 3.5 ve Şekil 3.6).

**Tablo 3.5.** Deney hayvanlarının papiler kas kasılma parametreleri.

	Maks. (mg)	TP (ms)	RT <sub>50</sub> (ms)
<b>K (n=9)</b>	415,09±51,14	89,58±3,56	63,92±2,90
<b>K+Can (n=10)</b>	426,08±56,34	86,33±2,00	65,89±2,87
<b>D (n=7)</b>	475,72±37,58	109,36±5,95*	100,86±5,99*
<b>D+Can (n=9)</b>	477,74±59,54	100,92±2,68	80,75±6,33 <sup>†</sup>

Gruplara ait kısaltmalar Tablo 3.1'deki gibidir. Papiler kas kasılma eğrilerinin maksimum gerimi (Max), tepeye çıkış süresi (TP) ve tepenin %50'sine iniş zamanı (RT<sub>50</sub>). Değerler ortalama±SEM olarak verilmiştir. n= Hayvan sayısı, \*p<0,05 vs K grubu, <sup>†</sup>p<0,05 vs D grubu.



**Şekil 3.6. Kasılma parametrelerinin değişimi.** Kontrol (K), diyabet (D) ve 4 hafta boyunca günde 5 mg/kg/gün candesartan-cilexetil verilmiş diyabet (D+Can) ve kontrol (K+Can) grupları için örnek kasılma eğrileri (A) ve ortalama değerler için çizdirilmiş histogram (B). Değerler ortalama±SEM olarak ifade edilmiştir. \* $p < 0,05$  vs K grubu, <sup>†</sup> $p < 0,05$  vs D grubu.

### 3.5. Hücre İçi Serbest $Ca^{2+}$ Derişimi Ölçümleri

Hücre İçi Serbest  $Ca^{2+}$  Derişimi ( $[Ca^{2+}]_i$ ) derişimi kalbin mekanik aktivitesini düzenleyen en önemli etkenler arasında yer almaktadır. Bu yüzden, diyabetin kardiyomiyositlerde  $[Ca^{2+}]_i$  homeostazını değiştirmiş olabileceği ve kasılmayı bu yolla bozabileceği düşünülerek  $[Ca^{2+}]_i$  değişimi ölçüldü. Ayrıca, bu yolla candesartan-cilexetil'in düzeltici etkilerinin kaynağının da belirlenebileceği düşünüldü.

İzole edilen kalp hücreleri Fura 2-AM yüklendikten sonra iki ucuna elektrot yerleştirilmiş küvete az sayıda hücre alınarak birkaç uyarı verilmiş ve elektriksel uyarıya cevap verebilenler seçilmiştir. Bir süre (~20 s) dinlenim durumundaki kardiyomiyositten bazal  $Ca^{2+}$  ölçülmesinin ardından 0,2 Hz frekansında elektriksel alan uyarısı verilerek transient  $Ca^{2+}$  cevapları da ölçülmüştür.

#### 3.5.1. Hücre İçi Serbest Bazal $Ca^{2+}$ Seviyeleri

Dinlenim durumundaki hücreden alınan başlangıçtaki ~20 s'lik sinyallerin ortalaması alınarak iki dalga boyunun floresan şiddetlerinin oranı türünden ifade edilmiştir ( $\Delta F_{340/380}$ ). Bu ölçümlerin sonucunda, D grubunun hücre İçi bazal  $Ca^{2+}$  seviyesinin K grubuna göre anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir. Buna karşılık 4 hafta candesartan-cilexetil verilmiş diyabetli sıçan kardiyomiyositlerinde hücre İçi serbest bazal  $Ca^{2+}$  seviyesinin D grubuna göre azaldığı ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Tablo 3.6 ve şekil 3.7). Fakat, D grubu kardiyomiyositlerinin BIM ile 4 saatlik inkübasyonu hücre İçi bazal  $Ca^{2+}$  değerlerinde önemli bir değişikliğe yol açmamıştır (Tablo 3.6 ve şekil 3.7).

K+Can ile K grupları kardiyomiyositlerinin hücre İçi bazal  $Ca^{2+}$  seviyeleri arasında bir farka rastlanmamıştır. Bunun yanında, BIM ile 4 saatlik inkübasyonun da K grubu hücrelerinde ölçülen hücre İçi bazal  $Ca^{2+}$  değerlerine etkisi olmadığı görülmüştür (Tablo 3.6 ve şekil 3.7).

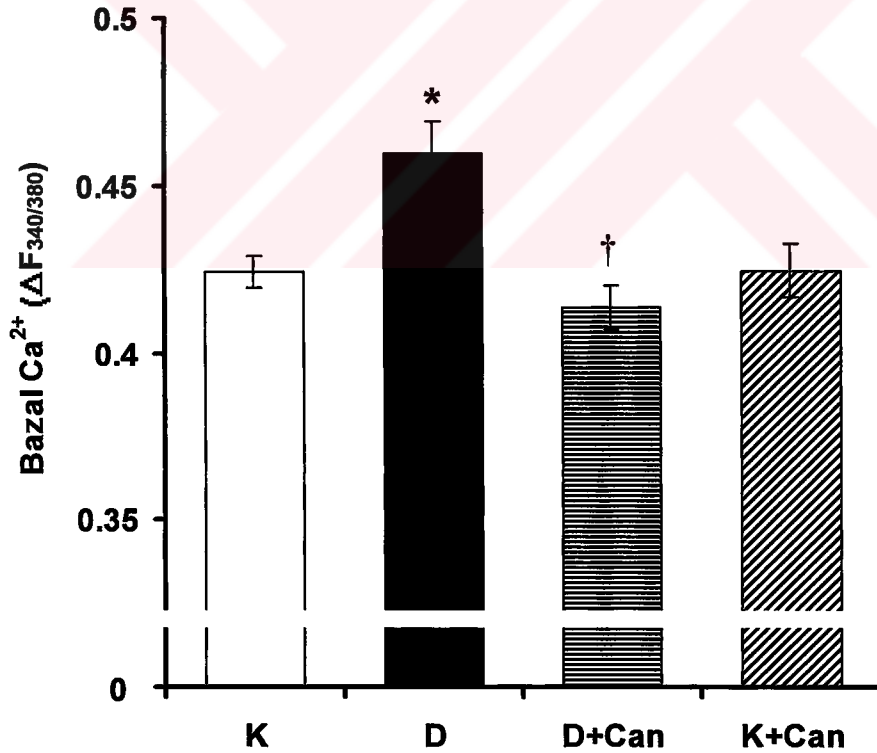


Bu sonuçlar, diyabetin kalp miyositlerinde  $Ca^{2+}$  yüklemesine neden olduğunu ve Ang II reseptör blokörü olan candesartan-cilexetil'in bu etkiyi ortadan kaldırdığını göstermektedir.

**Tablo 3.6..** Kardiyomiyositlerden kaydedilen hücre içi bazal  $Ca^{2+}$  değerleri.

	K (n=57)	K+Can (n=48)	D (n=60)	D+Can (n=55)	BIM İnc+D (n=29)	BIM İnc+K (n=28)
<b>Bazal <math>Ca^{2+}</math> Değerleri (<math>\Delta F_{340/380}</math>)</b>	0,42±0,00	0,42±0,01	0,46±0,01*	0,41±0,01 <sup>†</sup>	0,46±0,01*	0,43±0,01

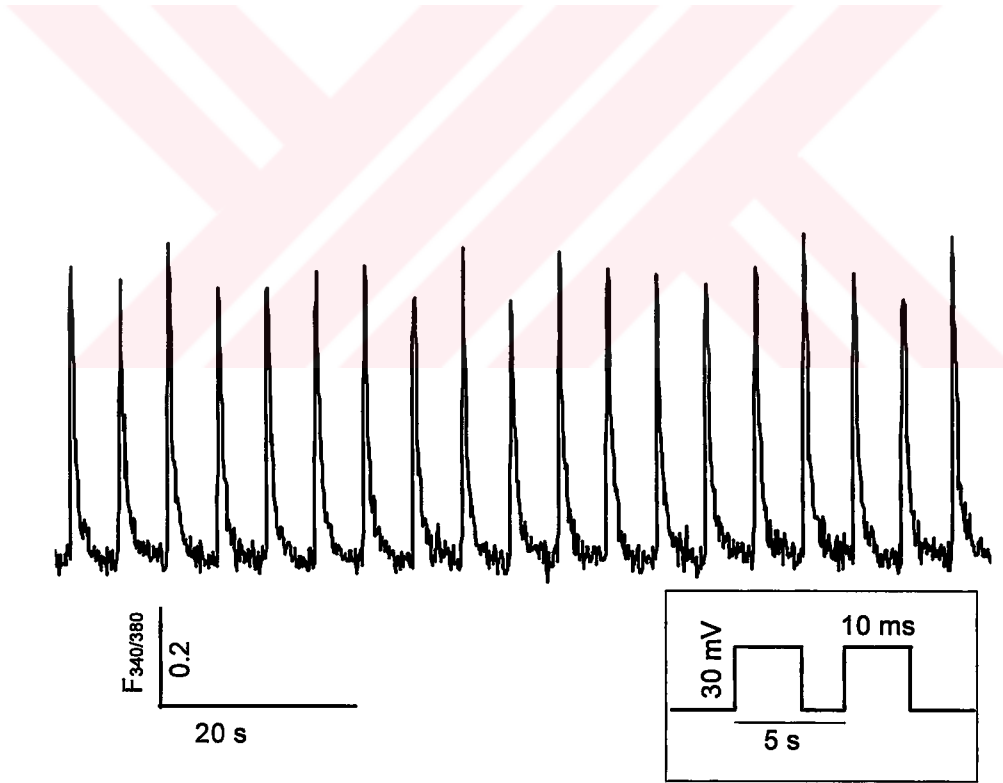
Kontrol (K), diyabet (D), 4 hafta boyunca 5 mg/kg/gün candesartan-cilexetil verilmiş kontrol (K+Can) ve diyabet (D+Can) grupları kardiyomiyositleri ile 4 saat 100 nM BIM ile inkübe edilen kontrol (BIM İnc+K) ve diyabetli (BIM İnc+D) kardiyomiyositlerden kaydedilen bazal  $Ca^{2+}$  düzeyleri. Değerler ortalama±SEM olarak ifade edilmişlerdir. n= Hücre sayısı, \*p<0,05 vs K grubu, <sup>†</sup>p<0,05 vs D grubu.



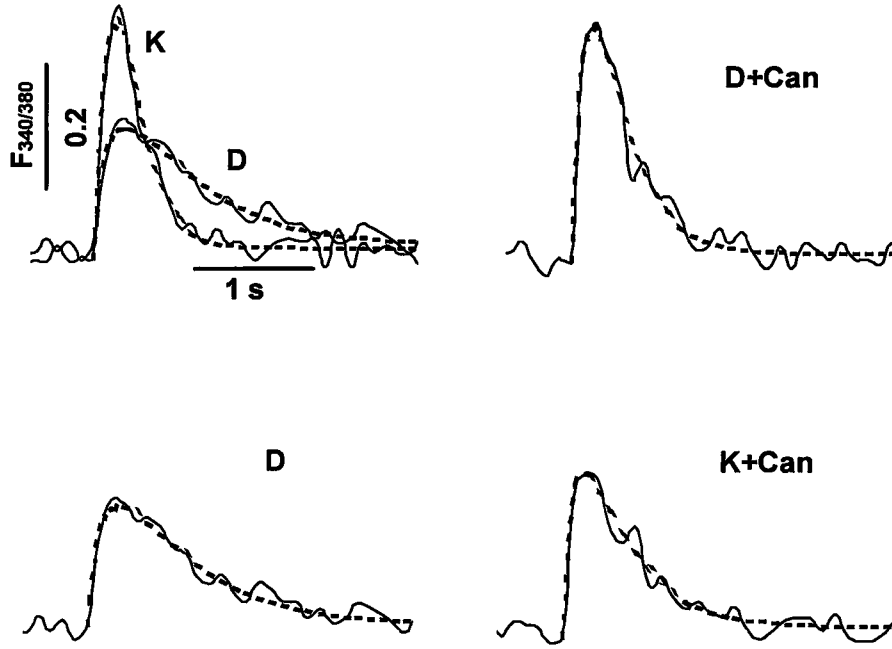
**Şekil 3.7. Grupların hücre içi serbest bazal  $Ca^{2+}$  seviyeleri.** Dinlenme durumundaki kontrol (K), diyabet (D), 4 hafta boyunca 5 mg/kg/gün candesartan-cilexetil verilen kontrol (K+Can) ve diyabet (D+Can) kardiyomiyositlerinden kaydedilen ~20 s'lik sinyallerin ortalama değerleri ve standart hatalar (ortalama±SEM). \*p<0,05 vs K grubu, <sup>†</sup>p<0,05 vs D grubu.

### 3.5.2. Hücre İçi $Ca^{2+}$ Transientleri

Bazal  $Ca^{2+}$  seviyesinin yanında, uyarılma durumunda  $[Ca^{2+}]_i$  değişimi ve kinetiği kasılmanın seyri açısından büyük önem taşımaktadır. Hücrelerin elektriksel uyarımı ile SR'dan sitoplazmaya salınan  $Ca^{2+}$ 'un miktarını ve bunun geri alınımının kinetiğini belirleyebilmek için her hücreden 0,2 Hz frekansındaki uyarılar ile 180-200 s boyunca kayıt alındı. Her hücre için bu süre boyunca gözlenen  $Ca^{2+}$  sinyalleri (transient) Excel ortamında tek tek uygun bir matematiksel fonksiyona (gama fonksiyonu) uydurulup parametreleri (Max, TP,  $DT_{50}$ ) ölçülmüş ve hücre bu süre boyunca kaydedilen  $Ca^{2+}$ -transientlerinin değerlerinin ortalaması ile temsil edilmiştir. Şekil 3.8'de bu türden örnek bir kayıt ve sağ alt köşesinde uyarının uygulama biçimi yer almaktadır. Şekil 3.9 ise, grupları temsil eden birer  $Ca^{2+}$  transientini ve onlara uydurulmuş eğrileri göstermektedir.



**Şekil 3.8. Hücre içi  $Ca^{2+}$  transientleri.** Bir kontrol kardiyomiyositinden uyarın etkisinde belli bir zaman boyunca kaydedilen hücre içi  $Ca^{2+}$  transientleri ve hücre uyarımı olarak elektriksel alan uyarısının uygulama biçimi.



**Şekil 3.9.** Gruplara ait örnek  $Ca^{2+}$  transienleri ve üzerlerine uydurulmuş fonksiyon (gama dağılım fonksiyonu) eğrisi (kesikli çizgi). Kontrol (K), diyabet (D), 4 hafta boyunca 5 mg/kg/gün candesartan-cilexetil verilmiş diyabet (D+Can) gruplarının kardiyomiyositleri ve 100 nM BIM ile 4 saat inkübe edilmiş diyabetik sıçan kardiyomiyositleri (BIM İnc+D) temsil edilmiştir. Transientler 10 ms süreli, 20-30 V'luk pulsların 0.2 Hz frekansında uygulanmasıyla elde edilmiştir.

Ölçülen ortalama değerler karşılaştırıldığında, diyabetin kontrole göre  $Ca^{2+}$  transienlerinin Max değerini düşürdüğü, TP'yi ve  $DT_{50}$ 'yi ise anlamlı düzeyde uzattığı görülmüştür. Bununla birlikte, 4 haftalık 5 mg/kg/gün candesartan-cilexetil uygulamasının diyabetin baskılamış olduğu genliği anlamlı derecede arttırdığı ve kinetik değerleri önemli ölçüde düzelttiği gözlenmiştir (Tablo 3.7 ve Şekil 3.10). Ayrıca, diyabetik sıçan kardiyomiyositleri bir PKC inhibitörü olan BIM ile 4 saat inkübe edildiğinde, benzer şekilde transienlerin hem genliklerinin, hem de kinetik parametrelerinin düzeldiği ve diyabetle karşılaştırıldığında bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.7).

Kronik candesartan-cilexetil uygulaması kontrol hayvanlarının izole kalp hücrelerinden ölçülen  $Ca^{2+}$  transienlerinin Max değerini K grubuna göre anlamlı derecede düşürmüştür. Buna ek olarak, K grubu ile karşılaştırıldığında,  $DT_{50}$

değerlerinde de bir uzama olduğu, fakat TP değerlerinin değişmediği görülmektedir (Tablo 3.7 ve Şekil 3.10).

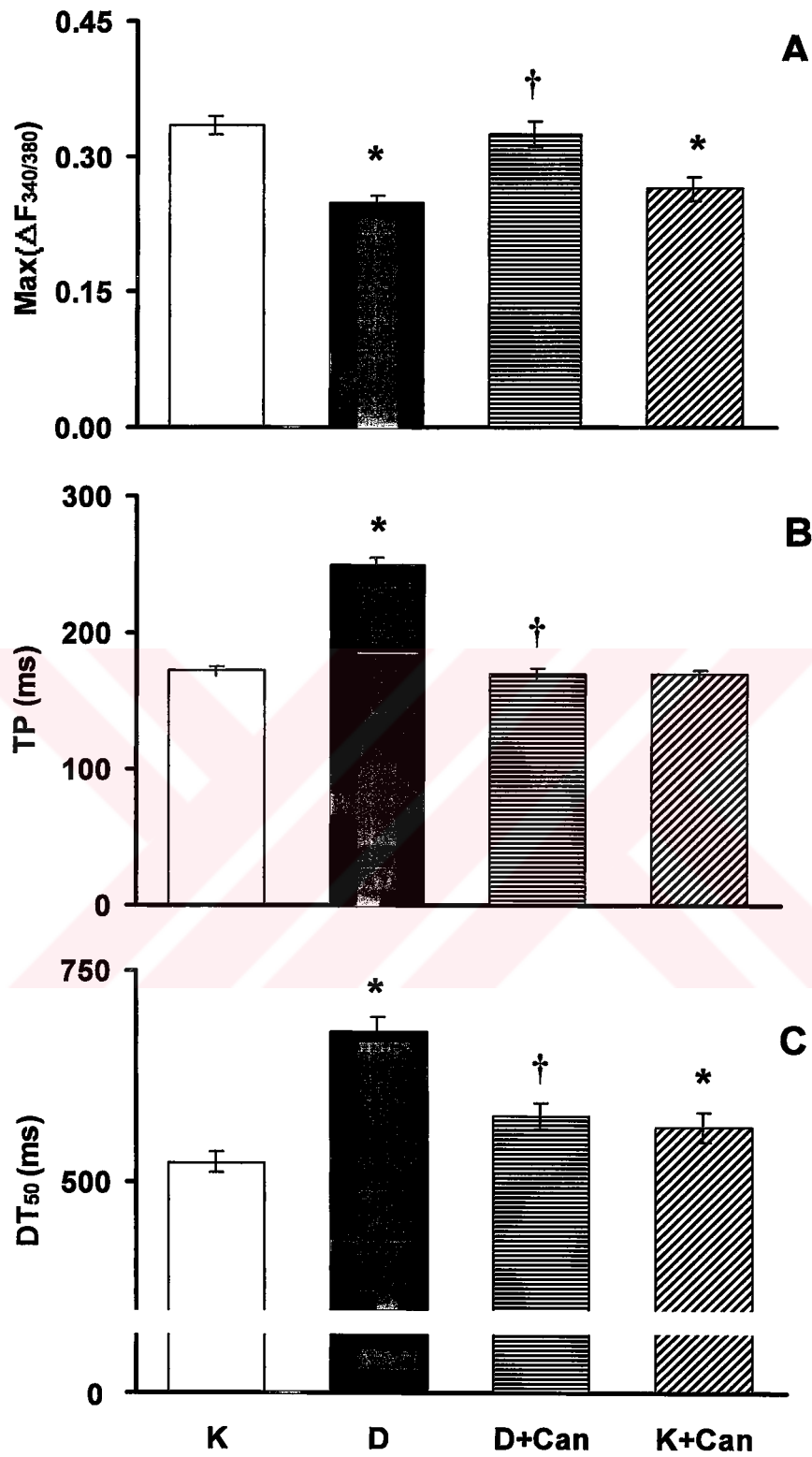
BIM ile 4 saat inkübe edildiğinde, K grubu kardiyomiyositlerinin  $Ca^{2+}$  transientlerinin genliği azaldığı halde,  $DT_{50}$  değerleri anlamlı seviyede uzamıştır. Buna karşılık, TP değerleri değişmemektedir (Tablo 3.7).

Sonuç olarak, diyabet uzun vadede kardiyomiyositlerin  $Ca^{2+}$  transientlerinde önemli değişikliklere neden olmakta; genliklerini baskımlarken, kinetik parametrelerini yavaşlatmaktadır. Buna karşılık, candesartan-cilexetil tedavisi bu değişikliklerin tamamını anlamlı derecede düzeltmektedir. PKC inhibisyonu da diyabetli kardiyomiyositlerde benzer bir düzelmeye neden olmaktadır. Normal sıçan kardiyomiyositlerinde candesartan-cilexetil'in ve BIM'in oluşturduğu değişiklikler bu sonuçları açıklayabilecek doğrultuda değildir. Aksine, bazı parametreleri diyabete benzer bir şekilde değiştirmektedirler.

**Tablo 3.7.** Kardiyomiyositlerden kaydedilen hücre içi  $Ca^{2+}$  transientlerinin analiz sonuçları.

	Max ( $\Delta F_{340/380}$ )	TP (ms)	$DT_{50}$ (ms)
<b>K (n=57)</b>	0,335±0,01	172,11±3,74	522,64±11,87
<b>K+Can (n=48)</b>	0,26±0,01*	169,36±3,70	563,74±18,35*
<b>D (n=60)</b>	0,25±0,01*	248,99±5,66*	676,77±16,98*
<b>D+Can (n=55)</b>	0,32±0,02 <sup>†</sup>	169,78±3,84 <sup>†</sup>	578,00±15,74 <sup>†</sup>
<b>BIM Inc+D (n=29)</b>	0,38±0,02 <sup>†</sup>	209,77±8,61 <sup>†</sup>	586,06±16,16 <sup>†</sup>
<b>BIM Inc+K (n=28)</b>	0,27±0,02*	180,13±6,96	685,24±40,67*

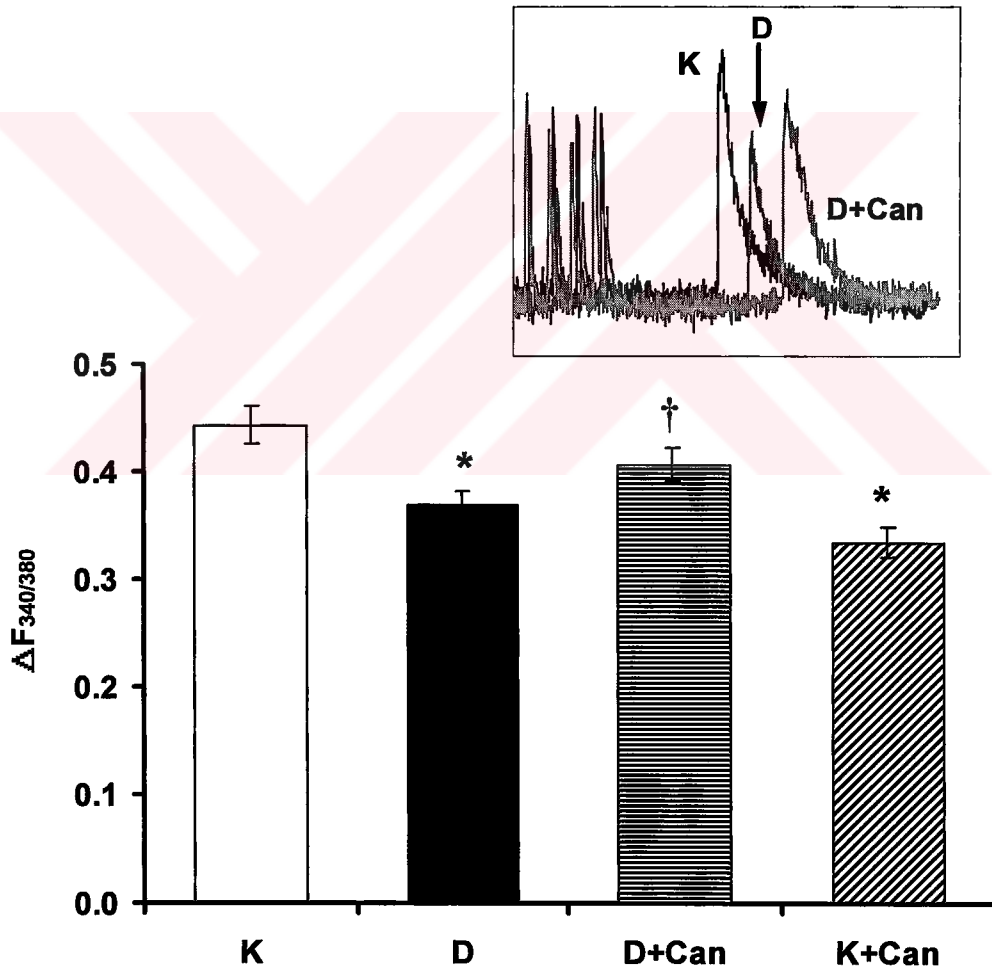
Gruplara ait kısaltmalar Tablo 3.6'daki gibidir. Kardiyomiyositlerden kaydedilen  $Ca^{2+}$  transientlerinin kinetik parametreleri (Max, TP,  $DT_{50}$ ). Değerler ortalama  $\pm$  SEM olarak ifade edilmişlerdir. n= Hücre sayısı, \* $p<0,05$  vs K grubu, <sup>†</sup> $p<0,05$  vs D grubu.



Şekil 3.10. Alan uyarısı ile kaydedilmiş  $Ca^{2+}$  transienleri. Transientlerden hesaplanan maksimum genliklerin ve kinetik parametrelerin ortalama değerleri (ortalama $\pm$ SEM). A; maksimum genlik ( $\Delta F_{340/380}$ ), B; tepeye çıkış süresi (TP), C; maksimum değer %50'sine iniş süresi (DT<sub>50</sub>). \* $p < 0,05$  vs K grubu, † $p < 0,05$  vs D grubu.

### 3.5.3. Ca<sup>2+</sup> Salımı ve Kafein Yanıtı

Ventrikül hücrelerinin 120 s boyunca uyarılmalarının ardından 10 mM kafein uygulamasıyla depolardaki Ca<sup>2+</sup>'un boşalması sağlandı. Ortalama değerler karşılaştırıldığında K grubuna (0,44 ± 0,02) göre D grubu (0,37 ± 0,01) kardiyomiyositlerinden salınan Ca<sup>2+</sup> miktarının daha düşük olduğu görülmüştür. Bunun yanında, 4 haftalık candesartan-cilexetil uygulamasının diyabetli hayvanların kafein yanıtlarını anlamlı derecede düzelttiği gözlemlendi (0,41 ± 0,02). Fakat, aynı uygulama normal sıçan kardiyomiyositlerinin kafein yanıtlarını baskılayıcı bir etki göstermiştir (0,33±0,01).



**Şekil 3.11. Kafein (10 mM) uyarımlı Ca<sup>2+</sup> salımı sonuçları.** Ventrikül hücreleri 120 s süreyle 0,2 Hz'lik frekansta uyarıldıktan sonra uyarı kesilmiş, 30 s sonra kafein mikropipet ile banyo ortamına eklenmiştir. Çerçevesi bölüm örnek kayıtları göstermektedir. Gruplara ait kısaltmalar diğer şekiller ile aynıdır. Değerler ortalama±SEM olarak ifade edilmiştir. \*P<0,05 vs K grubu, †p<0,05 vs D grubu.

#### 4. TARTIŞMA

Diyabetin lokal RAS aktivitesini ve RAS elemanlarının miktarını arttırdığı bilinmektedir. Bir çok çalışmada deneysel tip 1 diyabet modellerinde Ang II seviyesinin ve AT<sub>1</sub> reseptör yoğunluğunun arttığı ortaya konulmuştur (Sechi ve ark., 1994; Malhorta A. ve ark., 1997; Fiordaliso ve ark., 2000). Ayrıca, diyabetik sıçan kalbi PLC-DAG yolu üzerinden PKC aktivitesinin arttığı (Ishii ve ark., 1998; Shimoni, 1999; Shimoni ve Liu, 2003) ve hiperglisemik durumda bile AT<sub>1</sub> reseptör blokajının bu enzim aktivitesini normale çevirdiği gösterilmiştir (Malhorta ve ark., 1997; Malhorta ve ark., 2001). Bunlara ek olarak, Shimoni (2001), hem AT<sub>1</sub> reseptör blokörü olan valsartan'ın hem de ACE inhibitörü olan quinapril'in diyabetik kardiyomiyositlerde azalmış olan K<sup>+</sup> akımlarının yanında AP değişikliklerini de düzelttiğini göstermiştir. Ang II'nin etkinliğini ortadan kaldırmanın veya oluşumunu engellemenin diyabetin neden olduğu değişiklikleri ortadan kaldırdığını gösteren bu bulgular, Ang II sinyal zincirinin diyabetik kardiyomiyopatinin oluşumunda rol aldığına ilişkin iddiaları güçlendirmektedir.

Bizim çalışmamız da başka bir AT<sub>1</sub> reseptör blokörü olan candesartan'ın diyabetik kalpte oluşan mekanik ve elektriksel aktivite değişikliklerine olan etkisini ortaya koymakta ve bunların altında yatan mekanizmayı aydınlatmaya katkıda bulunacak deliller sunmaktadır. Öncelikle, kalp dokusundan AP kayıtlarının yanı sıra kasılma cevapları kaydedilmiş, arkasından iyonik akımlar ve [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> değişiklikleri de incelenerek konu bütünsel bir yaklaşımla ele alınmıştır.

Deney hayvanlarının genel özellikleri ve fiziksel durumlarına bakıldığında; başlangıçta dört gruptaki sıçanların sağlıklı bir görünüme sahip oldukları ve ağırlıklarının yaşlarına uygun seviyelerde ve birbirine yakın olduğu görülmektedir. Fakat, deney süresince diyabetli grupların kilo alımında bir duraklama olduğu hatta zayıfladıkları görülmüştür. Bu da, kan şekerinin artışına paralel olarak diyabette beklenen bir sonuçtur ve literatürdeki bulgularla uyumludur (Fein ve ark., 1980; McNeill ve ark., 1991; Ayaz ve ark., 2004). Gavaj yoluyla dört hafta boyunca

mideye doğrudan candesartan-cilexetil verilmesinin diyabetin neden olduğu bu fiziksel parametreleri genel olarak pozitif yönde değiştirmedeği gözlenmiştir. Buna karşılık, kontrol ve candesartan-cilexetil verilen kontrol gruplarının ağırlıkları deney süresi boyunca beklenen şekilde düzenli olarak artarken, kan şekeri düzeyleri değişmemiştir. Bu bulgular, kronik candesartan-cilexetil uygulamasının ne diyabetik ne de kontrol sıçanlarının izlenen kendilerine özgü fiziksel ve metabolik parametrelerini etkilemediğini göstermektedir.

Diyabetin kalp kası AP'nin repolarizasyon evresinin süresini uzattığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Shimoni ve ark., 1994; Ayaz ve ark., 2004). Bizim deneylerimizde de diyabetin papiler kas AP'nin repolarizasyon fazını anlamlı düzeyde uzattığı görülmüştür. Dört haftalık candesartan-cilexetil tedavisi bu değişikliği önemli ölçüde geri çevirmektedir. Diyabetik kalp AP'deki bu uzamaya neden olan mekanizmalara ilişkin çeşitli varsayımlar bulunmaktadır. Birçok çalışmada diyabetik kardiyomiyositlerde özellikle  $K^+$  akımlarının azalmasının AP'deki uzamaya neden olan faktörlerin başında geldiği iddia edilmektedir (Shimoni ve ark., 1994; Ayaz ve ark., 2004; Magyar ve ark., 1992). Çalışmamızın sonuçları, literatür bulgularıyla uyumlu bir şekilde diyabetin  $I_{to}$  ve  $I_{ss}$  akımlarını azalttığını göstermiştir. Bunun yanında, diyabetin  $I_{to}$ 'nun aktivasyon ve inaktivasyon kinetiklerini değiştirdiğini gösteren (Wang ve ark., 1995; Magyar ve ark., 1992) literatür bulgularına paralel olarak, aktivasyon ve inaktivasyon eğrilerinin  $\sim 5$  mV sola kaydığı görülmüştür. Buna ek olarak, diyabetli sıçanlara bir  $AT_1$  reseptör blokörü olan candesartan-cilexetil'in 4 hafta boyunca verilmesi diyabetik kardiyomiyositlerde azalmış olan  $K^+$  akımlarını düzeltmiştir. Ayrıca,  $I_{to}$ 'nun inaktivasyon eğrisinin düzeldiği, aktivasyon eğrisinin ise değişmediği gözlemlendi. Bulgularımız ile paralel olarak, Shimoni (2001)'nin de başka bir  $AT_1$  reseptör blokörü olan valsartan ile bu akımların düzeldiğini bildirmiş olması, Ang II reseptörlerinin diyabetik kardiyomiyositlerde gözlenen AP ve  $K^+$  akımı değişikliklerinde rolü olduğunu ve  $AT_1$  reseptör blokajının bu etkiyi geri çevirdiğini göstermektedir.



Kardiyak AP süresinin uzamasına neden olabilecek bir diğer iyon akımı da L-tipi  $Ca^{2+}$  akımıdır. Bugüne kadar, AP repolarizasyon süresinin uzamasından  $Ca^{2+}$  akımlarındaki artışın da sorumlu olduğu ileri sürülmüş (Hayashi ve Noda, 1997) olsa da,  $Ca^{2+}$  akımlarının değişmediğini (Jourdon ve Feuvray, 1993; Tsuchida ve ark., 1994) ve hatta azaldığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Wang ve ark., 1995). Deneylerimiz sonucunda 5 haftalık diyabetik sürecin L-tipi  $Ca^{2+}$  akımını etkilemediği gözlenmiştir. Böylece, AP'nin repolarizasyon fazının süresindeki uzamanın bu akımdaki bir değişikliğin sonucu olmadığı görülmüştür. Buna ek olarak, bu akımların aktivasyon ve inaktivasyon kinetiklerinin de değişmediğini ortaya koyan bulgularımız bu sonuçları pekiştirecek niteliktedir.

Diyabetin mikro/makrovasküler bulgulardan bağımsız olarak ortaya çıkan ve birçok hastanın ölümüne yol açan, özel bir tip kardiyomiyopatinin oluşumuna neden olduğu bilinmektedir (Fein, 1990). Diyabetik kardiyomiyopati diastolik ve sistolik fonksiyon bozukluklarına yol açmakta, başka bir deyişle kalp dokusunun gevşeme ve kasılma işlevlerinde anormalliklere neden olmaktadır. Diyabetik kalpte görülen bu yetmezliği yalnızca AP'ndeki değişiklik ile açıklamak olası görünmemektedir. AP ile  $[Ca^{2+}]_i$  homeostazı arasındaki ilişki henüz açıklığa kavuşturulamamış olmakla birlikte,  $[Ca^{2+}]_i$ 'nin kas aktivitesindeki rolü uzun zamandır bilinmektedir. Bu nedenle, diyabetin neden olduğu kasılma bozukluklarının kardiyomiyositlerin  $[Ca^{2+}]_i$  homeostazında gözlenen değişikliklerle yakından ilişkili olduğu düşünülmüş ve bu düşünce deneysel bulgularla desteklenmiştir (Ishikawa ve ark., 1999; Choi ve ark., 2002; Ye ve ark., 2003; Norby ve ark., 2004).

Diyabetin yol açtığı fonksiyonel değişimleri gözlemek ve candesartan tedavisinin buna etkisini araştırmak için, grupların kalplerinden izole edilen papiler kas demetleri uyarılarak kasılma cevapları da değerlendirilmiştir. Yapılan analizlerde, diyabetin literatürdeki bulgularla benzer şekilde (Ishikawa ve ark., 1999; Satoh ve ark., 2001; Trost ve ark., 2002) kalbin fonksiyonel yanıtlarını değiştirdiği (örneğin TP,  $RT_{50}$  gibi) gözlenirken, 4 haftalık candesartan-cilexetil tedavisinin bu parametrelerden  $RT_{50}$ 'yi tümüyle düzelttiği, TP'de ise kısmi, fakat istatistiksel olarak anlamlı seviyede olmayan bir iyileşmeye neden olduğu görülmüştür. Bu gözlemler,

Ang II reseptör sisteminin AP ve K<sup>+</sup> akımı değişiklikleri yanında, diyabette görülen fonksiyonel yetmezliklerin de oluşumunda rolü olduğunu ve reseptör blokajının bu anormallikleri geri çevirdiğini göstermektedir. Candesartan-cilexetil uygulamasının normal sıçanlarda bir değişiklik oluşturmadığının gözlenmesi, diyabetik kalpteki düzeltici etkisinin artmış olan Ang II sisteminin baskılanması sonucu ortaya çıktığını düşündürmektedir. Bununla bağlantılı olarak, kasılma cevaplarında oluşan değişikliklerin [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> homeostazı ile ilişkisinin belirlenmesi mekanizmanın aydınlatılması açısından önemli hale gelmektedir. Çünkü, kalbin kasılmasının temel aktörlerinden olan Ca<sup>2+</sup>,un düzenlenmesinde oluşabilecek değişiklikler doğrudan işlevsel bir etki yaratabilmektedir.

Ca<sup>2+</sup> kalp için hayati bir öneme sahip olsa da, normal koşullarda sitozolde konsantrasyonu düşüktür. Çünkü, hücreler için vazgeçilmez olan bu iyonun uzun süreli artışı hücredeki bazı enzimleri harekete geçirerek hücrenin ölümüne neden olabilmektedir (Hulsmann, 1983; Viarengo ve Nicotera, 1991; Sato ve ark., 1995; Gorza ve ark., 1996; Tsuji ve ark., 2001; Matsumura ve ark., 2001). Ancak, Ca<sup>2+</sup> hücrenin uyarılmasını takip eden kısa bir süre için geçici bir artış gösterir -ki bu kontraktıl makineyi harekete geçirir- arkasından, hızla dinlenim durumu konsantrasyonuna geri düşer. Bu yüzden, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> düzenlenmesi ve kontrol mekanizmalarının işleyişi ventrikül hücreleri için çok önemlidir. Bu nedenlerden dolayı, diyabetin [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> düzenlenmesine olan etkileri birçok çalışmaya konu olmuş ve kardiyak miyositlerin [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> seviyesini düzenleyen mekanizmalarda ciddi değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (Choi ve ark., 2002; Norby ve ark., 2004; Ye ve ark., 2003; Hayashi ve Noda, 1997; Dhalla ve ark.,1998; Pierce ve Russel,1997; Holloway ve ark., 1999).

Literatürde tip 1 diyabetin ventrikül hücrelerinde bazal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> seviyesini değiştirmedığı (Yu ve ark., 1997) ya da azalttığı (Hayashi ve Noda, 1997) yönünde iddialar ileri sürülmüştür. Ancak yakın zamanda Norby ve ark., (2004) STZ verilerek diyabet oluşturulmuş farelerde bazal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>'un arttığını gösteren, sonuçlarımızla uyumlu bulgularını yayınlamışlardır. Bizim çalışmamızda da, dinlenim durumundaki kardiyomiyositlerden yapılan kayıtlarda diyabetin bazal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> seviyesini arttırdığı

gözlenmiştir. Bunun yanında, 4 haftalık candesartan-cilexetil tedavisinin diyabetik kardiyomiyositlerin bazal  $[Ca^{2+}]_i$  seviyesini normal değerlerine düşürdüğü tespit edildi. Bulgularımız, diyabetik koşullarda dinlenim halinde bile ventrikül hücrelerinde  $Ca^{2+}$  yüklemesi olduğunu ve  $AT_1$  reseptör blokajının artmış olan sitozolik  $[Ca^{2+}]_i$  seviyesini düşürdüğünü göstermektedir. Literatürdeki sonuçlar arasındaki farklar diyabetin süresi, kayıtların alındığı ortam çözeltisinin içerdiği  $Ca^{2+}$  miktarı ve teknik farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

Bunların yanında, kalbin temel işlevi olan kasılma etkinliği sırasında  $[Ca^{2+}]_i$  seviyesinin nasıl değiştiği ve diyabetin bu değişime etkisi çok önemlidir. Nitekim, diyabetik kardiyomiyositlerde elektriksel uyarın ile kaydedilen  $Ca^{2+}$  transientlerinin genliğinin düştüğü, tepeye çıkış ve iniş zamanlarının ise uzadığı gösterilmiştir (Choi ve ark., 2002; Norby ve ark., 2004). Bununla birlikte Ye ve ark. (2003) farelerle yaptıkları deneylerde genetik yoldan oluşturulmuş diyabetin kinetik parametrelerde uzamaya neden olduğunu, fakat  $Ca^{2+}$  transientlerinin genliklerini değiştirmediğini göstermişlerdir. Oysa ki bizim çalışmamızda, diyabetin  $Ca^{2+}$  transientlerinin genlik değerlerini kontrol grubu miyositlerine göre düşürdüğü ve TP ve  $RT_{50}$  sürelerini uzattığı görüldü. Buna ek olarak,  $AT_1$  reseptör blokajının hem genliği hem de kinetik parametreleri düzelttiği tespit edildi.

Ayrıca, PKC inhibisyonunun candesartan-cilexetil uygulamasıyla benzer şekilde  $Ca^{2+}$  transientlerinin genliğini ve kinetik parametrelerini kontrol değerlerine yakın seviyelere çektiği görülmüştür. Bu sonuçlar diyabetik kalpte oluşan  $[Ca^{2+}]_i$  homeostazındaki değişikliklerin ve kasılma bozukluklarının Ang II ve onun sinyal sisteminin bir ajanı olan PKC ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Çünkü diyabetik sıçanlarda hem RAS'ın (Ang II,  $AT_1$  reseptörleri) etkinliğinin arttığı, (Sechi ve ark., 1994; Brown ve ark., 1997; Fiordaliso ve ark., 2000) hem de PKC'nin ekspresyonunda artış olduğu birçok deneyle gösterilmiştir (Malhorta ve ark., 1997; Ishii ve ark., 1998; Shimoni, 1999). Bunun yanında,  $AT_1$  reseptör uyarımının PLC aracılığıyla PKC'yi aktivelediği de bilinmektedir (Baker ve ark., 1992). Malhorta ve ark. (2001) hem Ang II, hem de glikoz ile inkübe edilen sıçan ventrikül hücrelerinde de PKC aktivitesinin arttığını,  $AT_1$  reseptör blokajının bu etkiyi ortadan

kaldırıldığını göstermişlerdir. Ayrıca, PKC'nin hücre içindeki  $Ca^{2+}$ 'un SR'a geri alımını engellediği de gösterilmiştir (Rogers ve ark., 1990). Nitekim, kafein deneylerinden elde ettiğimiz sonuçlar da diyabetli kardiyomiyositlerin hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarında azalma olduğunu ve  $AT_1$  reseptör blokajının bu etkiyi geri çevirdiğini göstermektedir. Bu da, PKC'nin SERCA aktivitesini azaltarak  $Ca^{2+}$  depolarının dolmasını engellediği görüşünü (Rogers ve ark., 1990) desteklemektedir.

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

Ancak çalışmamız,  $[Ca^{2+}]_i$  homeostazındaki bozukluklarda hangi düzenleyici proteinlerin (SERCA,  $Na^+/Ca^{2+}$  değiş-tokuşçusu, PMCA, PLB) rolü olduğunu ve  $AT_1$  reseptör blokajının bu proteinler üzerindeki etkisini göstermemektedir. Bu deneylerin yapılması  $AT_1$  reseptör blokörlerinin düzeltici etkisinin mekanizmasının aydınlatılmasını sağlayacaktır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, diyabetik koşullarda etkinliğinin arttığı gösterilmiş olan ve diyabete bağlı komplikasyonların gelişmesinden sorumlu olabileceği düşünülen Ang II sinyal yolağının inhibisyonunun, bu hastalıkta gelişen kalp yetmezliklerine etkisi ve bu etkinin mekanizması araştırılmıştır. Bunun için, kalbin elektriksel ve mekanik aktivitelerinin yanında, hücre içi iyon değişimleri de ölçülmüştür.

AT<sub>1</sub> reseptör blokörü olan candesartan-cilexetil'in 4 haftalık uygulama sonunda, diyabetli kalplerde uzadığı bilinen papiler kasının AP repolarizasyon süresini önemli derecede kısaltmaktadır.

Candesartan-cilexetil tedavisinin diyabetik kardiyomiyositlerin baskılanmış olan K<sup>+</sup> akımlarını normale çevirmektedir.

Candesartan-cilexetil tedavisi sonunda, diyabetli kardiyomiyositlerde bozulmuş olan hücre içi Ca<sup>2+</sup> homeostazı önemli derecede düzeltilmektedir.

Diyabetli kardiyomiyositlerin PKC inhibitörü olan BIM ile *in vitro* inkübasyonu da hücre içi Ca<sup>2+</sup> homeostazında AT<sub>1</sub> reseptör blokajı ile benzer etkiler göstermiştir. Bu sonuçlar, Ang II sinyal zincirinin bir basamağı olan PKC'nin diyabetik kalbin hücre içi Ca<sup>2+</sup> homeostazındaki bozukluklarda rolü olabileceğini göstermektedir.

Diyabetli sıçanlara 4 hafta boyunca candesartan-cilexetil verilmesi kalbin mekanik aktivitesinin bazı parametrelerini düzeltmektedir.

Sonuç olarak, candesartan-cilexetil tedavisinin diyabetli sıçan kalbinde bozulduğu bilinen elektriksel ve mekanik aktiviteyi düzeltmesi, Ang II sinyal yolağının bu bozukluklarda rolü olduğunu göstermektedir. Ayrıca, BIM'in de AT<sub>1</sub> reseptör blokajı ile benzer etkiler göstermesi, bu etkinin PKC üzerinden olduğuna işaret etmektedir.

Bu çalışma ile mevcut koşullarda anti-hipertansif bir ilaç olarak kullanılan candesartan-cilexetil'in, ilerde diyabetin yol açtığı kardiyovasküler sorunları gidermede de kullanılabileceği gösterilmiştir.

Bununla birlikte, bu sonuçları pekiştirecek ve etki mekanizmasının aydınlatılmasına katkıda bulunabilecek ek çalışmalar da gerekmektedir. Öncelikle, bu etkilerin Ang II sinyal zinciri üzerinden olduğunu ifade edebilmek için aynı reseptöre duyarlı başka blokörler kullanılarak benzer sonuçlara ulaşılabilmelidir. Bunu yanında, etki mekanizmasını anlamak için dolaylı olmayan ve açık kanıtlar ortaya konulmalıdır.



## ÖZET

### Anjiyotensin II Reseptörünün Deneysel Diyabetik Sıçan Kalbi Elektriksel Aktivitesindeki Rolü

Deneysel diyabette vasküler komplikasyonlardan bağımsız bir tip kardiyomiyopatinin geliştiği bilinmektedir. Diyabette kalp kasının kasılma ve gevşeme hızında azalma ve aksiyon potansiyeli (AP) süresindeki uzamanın yanında, hücre içi  $Ca^{2+}$  transienlerinin kinetiklerinin de değiştiği ifade edilmiştir. Bu çalışmanın amacı, kalbin mekanik ve elektriksel aktivitelerinde diyabetin yol açtığı bozukluklarda anjiyotensin II tip 1 ( $AT_1$ ) reseptörlerinin rolünü araştırmaktır. Bunun yanında, diyabetin kardiyomiyositlerin hücre içi  $Ca^{2+}$  homeostazında neden olduğu değişiklikler ve bunların Ang II sinyal yolağı ile ilişkisinin ortaya konması amaçlanmıştır. Sonuçlarımız diyabetik kardiyomiyositlerde  $Ca^{2+}$  transienlerinin tepeye çıkış süresi (TP)'nin ve tepeden %50'sine iniş süresi ( $DT_{50}$ )'nin arttığını, buna karşılık genliğin azaldığını göstermektedir. Ayrıca, bu hücrelerin bazal  $Ca^{2+}$  seviyelerinin de arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, bir  $AT_1$  reseptör blokörü olan candesartan-cilexetil (5 mg/kg/gün, 4 hafta süreyle) uygulamasının diyabetli ventrikül hücrelerinde bazal  $Ca^{2+}$  seviyelerini ve  $Ca^{2+}$ -transienlerinin değişmiş olan kinetik parametrelerini düzeltmiştir. Buna ek olarak, diyabet kasılma eğrisinin TP değerini ve gevşemenin %50'sine iniş süresini ( $RT_{50}$ ) uzatırken, candesartan-cilexetil tedavisi papiler kas demetinin değişmiş olan kasılma parametrelerini düzeltmiştir. Ayrıca, verilmesi diyabetik sıçanlarda uzamış olan AP süresini ve baskılanmış olan  $K^+$  akımlarını düzeltmektedir. Diyabetik sıçan izole kardiyomiyositleri protein kinaz C (PKC) inhibitörü olan bisindolylmaleimide I (BIM) ile inkübe edildiğinde, hücre içi  $Ca^{2+}$  transienlerinin kinetiklerini candesartan-cilexetil uygulamasına benzer şekilde etkilediği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, kardiyomiyositlerin hücre içi  $Ca^{2+}$  düzenlenmesinde ve izole kalp preparatlarının kasılma parametrelerinde ortaya çıkan diyabete bağlı değişikliklerde  $AT_1$  reseptörlerinin yer aldığını göstermektedir. Neticede, diyabetik sıçanların  $AT_1$  reseptör blokörü olan candesartan-cilexetil ile dört hafta tedavi edilmesi, ventrikül hücrelerinin hücre içi  $Ca^{2+}$  düzenlenmesindeki anormallikleri düzeltmenin yanında, izole kalp preparatlarının bozulmuş olan elektriksel ve mekanik aktivitelerini etkin bir şekilde geri çevirmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Aksiyon Potansiyeli, Candesartan, Hücre İçi Kalsiyum, Kalp, Papiler Kas, Tip I Diyabet.

## SUMMARY

### **The role of Angiotensin II receptor on electrical activity of experimental diabetic rat heart**

Experimental diabetes is known to be associated with a cardiomyopathy, which occurs even in the absence of vascular complications. Slowing down of cardiac muscle contractions and relaxations in association with altered kinetics of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  transients have been reported as well as prolongation in action potential duration in STZ-induced diabetes. The aim of this study was to investigate possible role of angiotensin II type 1 ( $\text{AT}_1$ ) receptors in the mechanical and electrical abnormalities of the diabetic rat heart. Additionally, diabetes-induced changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and its relation with Ang II signaling were also examined in cardiomyocytes. Our results showed that time to peak (TP) and half decay time ( $\text{DT}_{50}$ ) increased, while amplitude decreased in  $\text{Ca}^{2+}$  transients recorded from diabetic cardiomyocytes. We also observed an increase in basal  $\text{Ca}^{2+}$  levels of these cells. Nevertheless, treatment with  $\text{AT}_1$  receptor blocker candesartan-cilexetil (5 mg/kg/day for 4 weeks) restored basal  $\text{Ca}^{2+}$  levels and altered kinetics of the  $\text{Ca}^{2+}$  transients in diabetic ventricular cells. In addition, induction of diabetes resulted with an increase in time to peak (TP) and half relaxation time ( $\text{RT}_{50}$ ) of contraction twitch whereas, candesartan-cilexetil treatment also recovered these altered kinetics of contractile activity in papillary muscle strips. Moreover, treatment with an  $\text{AT}_1$  receptor blocker restored prolonged action potential duration and depressed  $\text{K}^+$  currents in diabetic rats. We also showed that the effect of incubation of isolated cardiomyocytes from diabetic rats with a protein kinase C (PKC) inhibitor bisindolylmaleimide I (BIM) have similar effects to the that of the candesartan-cilexetil treatment on the kinetics of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  transients. These results indicate that  $\text{AT}_1$  receptors are involved in diabetes-induced alterations in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  regulation of cardiomyocytes and contraction parameters of the isolated heart preparations. Thus, treatment of diabetic rats with an  $\text{AT}_1$  receptor blocker candesartan-cilexetil for four weeks can effectively reverse the anomalous electrical and mechanical activities in isolated heart preparations as well as restoration of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  regulation abnormalities in ventricular cells.

**Key Words:** Action Potential, Candesartan, Heart, Intracellular Calcium, Papillary Muscle, Type I Diabetes.



## KAYNAKLAR

- AIELLO, E.A., CINGOLANI, H.E. (2001). Angiotensin II stimulates cardiac L-type  $Ca^{2+}$  current by a  $Ca^{2+}$ - and protein kinase C-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**: H1528-H1536.
- AMOS, A.F., MCCARTY, D.J., ZIMMET, P. (1997). The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diab. Med.* **14 Suppl. 5**: S1-S85.
- AYAZ, M., OZDEMIR, S., UGUR, M., VASSORT, G., TURAN, B. (2004). Effects of selenium on altered mechanical and electrical cardiac activities of diabetic rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **426**: 83-90.
- BROWN, L., WALL, D., MARCHANT, C., SERNIA, C. (1997). Tissue-specific changes in angiotensin II receptors in streptozotocin-diabetic rats. *J Endocrinol.* **154**: 355-362.
- BAKER, K.M., BOOZ, G.W., DOSTAL, D.E. (1992). Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac rennin-angiotensin system. *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 227-241.
- BERS, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* **415**: 198-204.
- BRACKEN, N.K., SINGH, J., WINLOW, W., HOWARTH, F.C. (2003). Mechanisms underlying contractile dysfunction in streptozotocin-induced type 1 and type 2 diabetic cardiomyopathy. In: *Atherosclerosis, hypertension and diabetes*, Ed.: G.N. Pierce, M. Nagano, P. Zahradka, N.S. Dhalla. Boston:Kluwer Academic Publishers, p.: 386-407.
- CHOI, K.M., ZHONG, Y., HOIT, B.D., GRUPP, I.L., HAHN, H., DILLY, K.W., GUATIMOSIM, S., LEDERER, W.J., MATLIB, M.A. (2002). Defective intracellular  $Ca^{2+}$  signaling contributes to cardiomyopathy in type 1 diabetic rats. *Am. J. Physiol.* **283**: H1398-H1408.
- CHUNG, O., UNGER, T. (1998). Pharmacology of angiotensin receptors and AT1 receptor blockers. *Basic. Res. Cardiol.* **93**: 15-23.
- DE MELLO, W.C., JAN DANSER, A.H. (2000). Angiotensin II and the heart. *Hypertension.* **35**: 1183-1188.
- DHALLA, N.S., LIU, X., PANAGIA, V., TAKEDA, N. (1998). Subcellular remodeling and heart dysfunction in chronic diabetes. *Cardiovasc. Res.* **40**: 239-247.
- DHALLA, N.S., PIERCE, G.N., INNES, I.R., BEAMISH, R.E. (1985). Pathogenesis of cardiac dysfunction in diabetes mellitus. *Can. J. Cardiol.* **1**: 263-281.

- DINH, D.T., FRAUMAN, A.G., JOHNSTON, C.I., FABIANI, M.E. (2001). Angiotensin receptors: distribution, signaling and function. *Clin. Sci.* **100**: 481-492.
- DOSTAL, D.E. (2000). The cardiac renin-angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. *Reg. Pep.* **91**: 1-11.
- FEIN, F.S. (1990). Diabetic cardiomyopathy. *Diab. Care.* **13**: 1169-1179.
- FEIN, F.S., KORNSTEIN, L.B., STROBECK, J.E., CAPASSO, J.M., SONNENBLICK, E.H. (1980). Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circ. Res.* **47(6)**: 922-33.
- FEIN, F.S., SONNENBLICK, E.H. (1985). Diabetic cardiomyopathy. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **27(4)**: 255-70.
- FIORDALISO, F., LI, B., LATINI, R., SONNENBLICK, E.H., ANVERSA, P., LERI, A., KAJSTURA, J. (2000). Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats is angiotensin II-dependent. *Lab. Invest.* **80(4)**: 513-527.
- FLACK, J.M., HAMATY, M., STAFFILENO, B.A. (1998). Renin-angiotensin-aldosterone-kinin system influences on diabetic vascular disease and cardiomyopathy. *Miner. Electrolyte. Metab.* **24**: 412-422.
- GALDERISI, M., ANDERSON, K.M., WILSON, P.W., LEVY, D. (1991). Echocardiographic evidence for the existence of a distinct diabetic cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* **68(1)**: 85-9.
- GORZA, L., MENABO, R., VITADELLO, M., BERGAMINI, C.M., DI LISA, F. (1996). Cardiomyocyte troponin T immunoreactivity is modified by cross-linking resulting from intracellular calcium overload. *Circulation.* **93(10)**: 1896-904.
- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M., TSIEN, R. (1985). A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**: 3440-3450.
- HATTORI, Y., MATSUDA, N., KIMURA, J., ISHITANI, T., TAMADA, A., GANDO, S., KEMMOTSU, O., KANNO, M. (2000). Diminished function and expression of the cardiac  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$  exchanger in diabetic rats: implication in  $Ca^{2+}$  overload. *J. Physiol.* **1**: 85-94.
- HAYASHI, H., NODA, N. (1997). Cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration decreases in diabetic rat myocytes. *Cardiovasc. Res.* **34**: 99-103.
- HOENACK, C., ROESEN, P. (1996). Inhibition of angiotensin type 1 receptor prevents decline of glucose transporter (GLUT4) in diabetic rat heart. *Diabetes.* **45**: S82-S87.
- HOLLOWAY, C., KOTSANAS, G., WENDT, I. (1999). Acute effects of taurine on intracellular calcium in normal and diabetic cardiac myocytes. *Pflugers. Arch.* **438**: 384-391.

- HULSMANN, W.C. (1983). On the mechanism of the calcium paradox: the release of hydrolytic enzymes. *Eur. Heart. J. Suppl H*: 57-61.
- ISHII, H., KOYA, D., KING, G. L. (1998). Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J. Mol. Med.* **76**: 21-31.
- ISHIKAWA, T., KAJIWARA, H., KURIHARA, S. (1999). Alterations in contractile properties and Ca<sup>2+</sup> handling in streptozotocin-induced diabetic rat myocardium. *Am. J. Physiol.* **277**: H2185-2194.
- JANVIER, N.C., BOYETT, M.R. (1996). The role of Na-Ca exchange current in the cardiac action potential. *Cardiovasc. Res.* **32**: 69-84.
- JOURDON, P., FEUVRAY, D. (1993). Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *J. Physiol.* **470**: 411-429.
- KLABUNDE, R.E. (02.07.2004). Cardiovascular physiology concepts: Renin-Angiotensin system. Erişim: [<http://cvphysiology.com/Blood%20Pressure/BP015.htm>]. Erişim tarihi: 10.09.2004.
- LAGADIC-GOSSMANN, D., BUCKLER, K.J., LE PRIGENT, K., FEUVRAY, D. (1996). Altered Ca<sup>2+</sup> handling in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *Am. J. Physiol.* **270**: H1529-1537.
- MAGYAR, J., RUSZNAK, Z., SZENTESI, P., SZUCS, G., KOVACKS, L. (1992). Action potentials and potassium currents in rat ventricular muscle during experimental diabetes. *J. Moll. Cell. Cardiol.* **24**: 841-853.
- MAHGOUB, M.A., ABD-ELFATTAH, A.S. (1998). Diabetes mellitus and cardiac function. *Moll. Cell. Biochem.* **180**: 59-64.
- MALHOTRA, A., BARINDER, P.S.K., CHEUNG, S., OPAWUMI, D., MEGGS L.G. (2001). Angiotensin II promotes glucose-induced activation of cardiac protein kinase C isozymes and phosphorylation of troponin I. *Diabetes.* **50**: 1918-1926.
- MALHOTRA, A., REICH, D., REICH, D., NAKOUZI, A., SANGHI, V., GEENEN, D.L., BUTTRICK, P.M. (1997). Experimental diabetes is associated with functional activation of protein kinase C $\epsilon$  and phosphorylation of troponin I in the heart, which are prevented by angiotensin II receptor blockade. *Circ. Res.* **81**: 1027-1033.
- MATSUMURA, Y., SAEKI, E., OTSU, K., MORITA, T., TAKEDA, H., KUZUYA, T., HORI, M., KUSUOKA, H. (2001). Intracellular calcium level required for calpain activation in a single myocardial cell. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33(6)**:1133-42.
- MCNEILL, JH., DELGATTY, HL., BATTELL, ML. (1991). Insulinlike effects of sodium selenate in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* **40(12)**: 1675-8.

- MUKHERJEE, R., SPINALE, F.G. (1999). Alterations in ionic currents and relation to contractile dysfunction with severe cardiac hypertrophy and failure. *Heart. Fail. Rev.* **4**: 319-327.
- NORBY, F.L., ABERLE II, N.S., KAJSTURA, J., ANVERSA, P., REN, J. (2004). Transgenic overexpression of insulin-like growth factor I prevents streptozotocin-induced cardiac contractile dysfunction and  $\beta$ -adrenergic response in ventricular myocytes. *J. Endocrinol.* **180**: 175-182.
- NORBY, F.L., WOLD, L.E., DUAN, J., HINTZ, K.K., REN, J. (2002). IGF-I attenuates diabetes-induced cardiac contractile dysfunction in ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **283**(4): E658-66.
- PIERCE, G.N., RUSSEL, J.C. (1997). Regulation of intracellular  $Ca^{2+}$  in the heart during diabetes. *Cardiovasc. Res.* **34**:41-47.
- REN, J., WALSH, M.F., HAMATY, M., SOWERS, J.R., BROWN, R.A. (1999). Augmentation of the inotropic response to insulin in diabetic rat hearts. *Life.Sci.* **65**(4): 369-380.
- ROGERS, T.B., GAA, S.T., MASSEY, C., DOSEMECI, A. (1990). Protein kinase C inhibits  $Ca^{2+}$  accumulation in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **265**(8): 4302-4308.
- ROZANSKI, G.J., XU, Z. (2002). Sulfhydryl modulation of  $K^+$  channels in rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**: 1623-1632.
- SATO, N., FUJIO, Y., YAMADA-HONDA, F., FUNAI, H., WADA, A., KAWASHIMA, S., AWATA, N., SHIBATA, N. (1995). Elevated calcium level induces calcium-dependent proteolysis of A-CAM (N-cadherin) in heart--analysis by detergent-treated model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**(2): 649-53.
- SATOH, N., SATO, T., SHIMADA, M., YAMADA, K., KITADA, Y. (2001). Lusitropic effect of MCC-135 is associated with improvement of sarcoplasmic reticulum function in ventricular muscles of rats with diabetic cardiomyopathy. *J. Pharm. Exp. Ther.* **298**: 1161-1166.
- SECHI, L.A., GRIFFIN, C.A., SCHAMBELAN, M. (1994). The cardiac renin-angiotensin system in STZ-induced diabetes. *Diabetes.* **43**: 1180-1184.
- SHIMONI, Y. (1999). Protein kinase C regulation of  $K^+$  currents in rat ventricular myocytes and its modification by hormonal status. *J. Physiol.* **520**(2): 439-449.
- SHIMONI, Y. (2001). Inhibition of the formation or action of angiotensin II reverses attenuated  $K^+$  currents in type 1 and type 2 diabetes. *J. Physiol.* **537**(1): 83-92.
- SHIMONI, Y., FIREK, L., SEVERSON, D., GILES, W. (1994). Short-term diabetes alters  $K^+$  currents in rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* **74**: 620-628.

- SHIMONI, Y., LIU, X-F. (2003). Role of PKC in autocrine regulation of rat ventricular K<sup>+</sup> currents by angiotensin and endothelin. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **284**: H1168-H1181.
- STANLEY, W.C., LOPASCHUK, G.D., MCCORMACK, J.G. (1997). Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovasc Res.* **34**(1): 25-33.
- SZKUDELSKI, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in  $\beta$  cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* **50**: 536-546.
- TESHIMA, Y., TAKAHASHI, N., SAIKAWA, T., HARA, M., YASUNAGA, S., HIDAHA, S., SAKATA, T. (2000). Diminished expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and ryanodine sensitive Ca(2+)Channel mRNA in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**(4): 655-64.
- TROST, S.U., BELKE, D.D., BLUHM, W.F., MEYER, M., SWANSON, E., DILLMANN, W.H. (2002). Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes.* **51**: 1166-1171.
- TSUCHIDA, K., WATAJIMA, H., OTOMO, S. (1994). Calcium current in rat diabetic ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* **267**: H2280-H2289.
- TSUJI, T., OHGA, Y., YOSHIKAWA, Y., SAKATA, S., ABE, T., TABAYASHI, N., KOBAYASHI, S., KOHZUKI, H., YOSHIDA, K.I., SUGA, H., KITAMURA, S., TANIGUCHI, S., TAKAKI, M. (2001). Rat cardiac contractile dysfunction induced by Ca<sup>2+</sup> overload: possible link to the proteolysis of alpha-fodrin. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **281**(3): H1286-94.
- VANDER, A.J., SHERMAN, J.H., LUCIANO, D.S. (1994). Human physiology: The mechanism of body function. McGraw Hill. Inc., International Edition.
- VIARENGO, A., NICOTERA, P. (1991). Possible role of Ca<sup>2+</sup> in heavy metal cytotoxicity. *Comp. Biochem. Physiol.* **100C**(1/2): 81-84.
- WAHLER, G.M. (1997). Cardiac action potentials. In: *Cell Physiology*, Ed.: N. Sperelakis. New York, Academic Press, p.: 780-790
- WANG, D.W., KIYOSUE, T., SHIGEMATSU, S., ARITA, M. (1995). Abnormalities of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in ventricular myocytes from rats with chronic diabetes. *Am. J. Physiol.* **269**: H1288-H1296.
- YE, G., METREVELI, N.S., REN, J., EPSTEIN, P.N. (2003). Metallothionein prevents diabetes-induced deficits in cardiomyocytes by inhibiting reactive oxygen species production. *Diabetes.* **52**: 777-783.
- YU, J.Z., RODRIGUES, B., MCNEIL, J.H. (1997). Intracellular calcium levels are unchanged in the diabetic heart. *Cardiovasc. Res.* **34**: 191-198.

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



## ÖZGEÇMİŞ

### I- BİREYSEL BİLGİLER

Adı: Semir  
Soyadı: ÖZDEMİR  
Doğum yeri ve tarihi: Antakya - 03.06.1973  
Uyruğu: T.C.  
Medeni durumu: Evli  
İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyofizik A.B.D.-0312 3103010/337

### II- EĞİTİMİ

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Yüksek Lisansı  
(1997-2000)  
Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (1991-  
1997)  
Antakya Merkez Lisesi (1988-1991)  
Oğlakören Köyü Ortaokulu (1985-1988)  
Kuzeytepe Köyü Atatürk İlkokulu (1980-1985)  
Yabancı dili: İngilizce

### III- MESLEKİ DENEYİMİ

Araştırma Görevlisi: Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik ABD  
(26.10. 1997-28.08.2000).  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik ABD (28.08.2000 - )

#### IV- BİLİMSEL İLGİ ALANLARI

##### Yayınlari:

- 1) **Ozdemir S., Yargıçoğlu P., Agar A., Gümüşlü S., Hacıoğlu G.** (2002). Role of nitric oxide on age-dependent alterations: Investigation of electrophysiologic and biochemical parameters. *Int. J. Neurosci.* 112: 263-276.
- 2) **Ayaz M., Can B., Ozdemir S., Turan B.** (2002). Protective effect of selenium treatment on diabetes induced structural alterations. *Biol. Trace Elem. Res.* 89, 215-226.
- 3) **Ugur M., Ayaz M., Ozdemir S., Turan B.** (2002). Toxic concentrations of selenite shortens repolarisation phase of action potential in rat papillary muscle. *Biol. Trace Elem. Res.* 89: 227-238.
- 4) **Yaras N., Yargıçoğlu P., Agar A., Gümüşlü S., Abidin I., Ozdemir S.** (2003). Effect of immobilization stress on visual evoked potentials. *Int. J. Neurosci.* 113: 1055-1067.
- 5) **Ozdemir S., Ayaz M., Tuncer T., Ugur M., Turan B.** (2003). Vegetable Oils used as Vitamin E vehicle affects the Electrical Activity of Rat Heart. *Physiol. Res.*, 52: 767-771.
- 6) **Ayaz, M., Ozdemir, S., Ugur, M., Vassort, G., Turan, B.** (2004). Effects of selenium on altered mechanical and electrical cardiac activities of diabetic rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 426: 83-90.
- 7) **Özdemir, S., Ayaz, M., Can, B., Turan, B.** (2004). Effects selenite treatment on ultrastructural changes in experimental diabetic rat bones. *Biol. Trace Elem. Res.* (yayına kabul edildi).

##### Sunumlar:

- 1) **Turan B., Ayaz M., Özdemir S., Uğur M.** Selenium shortens the prolonged action potentials in experimental diabetic rat hearts. ISHR Montreal, Diseases of the Cardiovascular System and Immunity, 12-15 July, 2001, Montreal, Canada. O14.
- 2) **Özdemir S., Ayaz M., Uğur M., Turan B.** In vivo selenit uygulamasının diyabetik kardiyomiyopatiye pozitif etkilerinin patch-clamp tekniği ile incelenmesi. XIII. Ulusal Biyofizik Kongresi, 5-7 Eylül 2001, Eskişehir, Bildiri Özetleri Kitapçığı, sayfa: S1.



- 3) **Ayaz M., Özdemir S., Uğur M., Turan B.** In vivo selenit uygulamasının normal sıçan kalbi elektriksel aktivitesine etkilerinin elektrofizyolojik tekniklerle incelenmesi. XIII. Ulusal Biyofizik Kongresi, 5-7 Eylül 2001, Eskişehir, Bildiri Özetleri Kitapçığı, sayfa: S4.
- 4) **Turan B., Ayaz M., Özdemir S., Uğur M., Vassort G.** Selenite restores diminished K currents in diabetic rat heart. 22<sup>nd</sup> European Section meeting of the International Society for Heart Research, 3-6 July, 2002 – Szeged, Hungary. Abstract in: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2002, 34(6): A65.
- 5) **Ayaz M., Ozdemir S., Uğur M., Uğur Ö., Turan B.** Diyabetik sıçan kalbi  $\beta$ -adrenoseptör yanıtlarının moleküler mekanizması. 14. Ulusal Biyofizik Kongresi, 4-6 Eylül 2002, Ankara. Özet Kitapçığı S: 34.
- 6) **Ozdemir S., Ayaz M., Uğur M., Turan B.** Anjiyotensin reseptör (AT1) antagonistinin diyabetik kardiyomiyopatiye etkisi. 14. Ulusal Biyofizik Kongresi, 4-6 Eylül 2002, Ankara. Özet Kitapçığı S:
- 7) **Yaras N., Ayaz M., Ozdemir S., Uğur M., Turan B.** Interpretation of relevance of sodium-calcium exchange in action potential of diabetic rat heart by mathematical model. ISHR 24<sup>th</sup> Annual Scientific Sessions, European Section of the International Society for Heart Research, 2-6 June, 2004 –Dresden, Germany. Abstract in: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 36: A152.
- 8) **Uğur M., Ozdemir S., Turan B., Gurdal H.** Candesartan treatment restores diabetes-induced changes in  $[Ca^{2+}]_i$  transients of cardiomyocytes and papillary muscle contractile function. 4<sup>th</sup> Congress of the Federation of the European Pharmacological Societies (EPHAR), 14-17 July 2004. Porto, Portugal. Abstract in: *Fund. Clin. Pharmacol.* 18 Suppl 1: P13.16.
- 9) **Ozdemir S., Uğur M., Gurdal H., Turan B.** Candesartan treatment restores diabetes-induced changes in  $[Ca^{2+}]_i$  transients in cardiomyocytes. Heart Failure Society of America 8<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, 2004. Abstract in: *J. Cardiac Fail.* 10(4): S75.

## V- BİLİMSEL ETKİNLİKLERİ

### Projeler

Ank. Üniv. BAP 2003.08.09.110 (Yardımcı Araştırmacı)

Ank. Üniv. BAP 2003.08.09.098 (Yardımcı Araştırmacı)

**Verdiği Seminerler:**

Bağlanma Eğrilerinin Özellikleri

Renin-Anjiyotensin Sistemi ve Diyabetik Kardiyomiyopati

