

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU

Sakubitril/Valsartan kombinasyonunun diabetik kalpte kasılma-gevşeme yolağındaki bazı bileşenlerin protein ifadesi üzerine etkisi

Proje Yürütücüsü

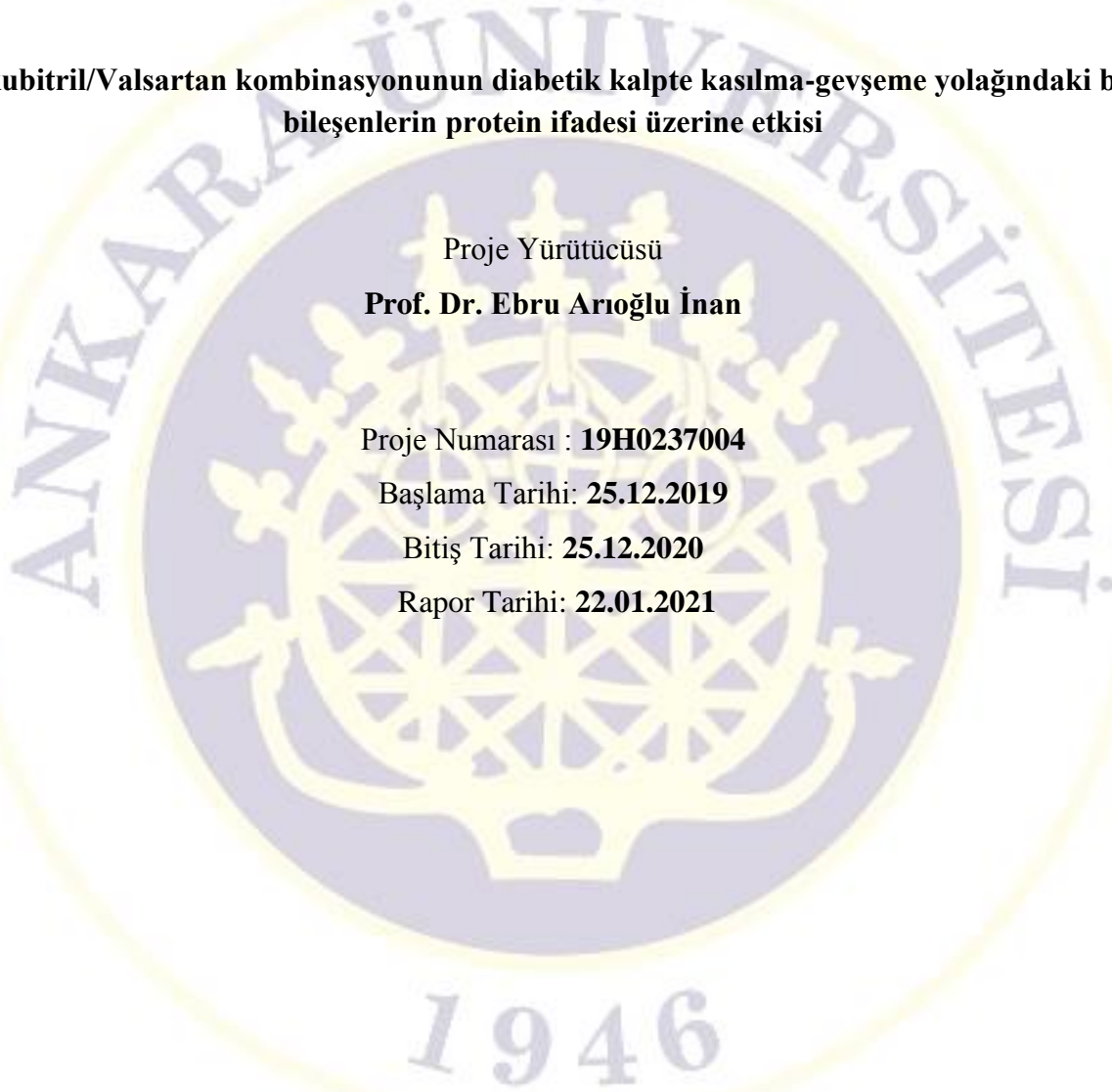
Prof. Dr. Ebru Arıoğlu İnan

Proje Numarası : **19H0237004**

Başlama Tarihi: **25.12.2019**

Bitiş Tarihi: **25.12.2020**

Rapor Tarihi: **22.01.2021**



Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri

Ankara - " 2021 "

I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

Sakubitril/Valsartan kombinasyonunun diabetik kalpte kasılma-gevşeme yolağındaki bazı bileşenlerin protein ifadesi üzerine etkisi

Diabet, insülin salıverilmesinde ve/veya insülin duyarlılığında azalmaya bağlı olarak ortaya çıkan kronik, endokrin bir hastalıktır. Diabetik morbidite ve mortalitenin en önemli nedeni diabete bağlı gelişen kardiyovasküler komplikasyonlardır. Artmış renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi aktivasyonu ve beta adrenerjik reseptör (β -AR) aracılı yanıtlarda azalma diabete kardiyak disfonksiyon oluşumunda rol oynayan önemli faktörlerdir. Diabette kan şekerini düzenleyen ilaçların yanı sıra diabette gelişen kardiyak komplikasyonların tedavisinde kullanılacak yeni ve etkili ilaçların geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Sakubitril/valsartan kombinasyonu bir neprilisin inhibitörü olan sakubitril ile bir anjiyotensin reseptör blokeri olan valsartanın 1:1 kombinasyonudur. İlaç kalp yetmezliği tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır ve bunun yanı sıra prelinik çalışmalarla diabetik kalp üzerindeki olumlu etkileri gösterilmiştir. Ne var ki, bu olumlu etkilerin altında yatan mekanizma kesin olarak aydınlatılmamıştır. Bununla birlikte sakubitril/valsartanın diabetik kalpte kasılma ve gevşeme yanıtlarına aracılık eden yolları nasıl etkilediğini değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu noktadan hareketle, diabetik kalpte sakubitril/valsartan kombinasyonunun β_1 -, β_2 - ve β_3 -AR alt tipleri ile kasılma ve gevşeme yanıtlarında rol oynayan alt yolak bileşenlerinin protein düzeyleri üzerine etkisinin Western blot deneyleriyle değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırma tek-yönlü ANOVA ve Bonferroni post-hoc testi ile yapılmış olup, istatistiksel analiz $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir. Kardiyak gevşeme yanıtında rol oynayan SERCA2a ve p-PLN/PLN protein ifadenme düzeylerinin diabette azalmış olması ve her iki tedaviyle de düzelmemesi, ilaçların oluşturulan tip 2 diabet modelinde kardiyak diyastolik disfonksiyon üzerinde olumlu etkilerinin olmadığını göstermektedir. β_1 -, β_2 - ve β_3 -AR'ler ile eNOS ve p-eNOS ifadenme düzeylerinin diabete bağlı olarak nasıl değiştiği ya da tedavinin bu düzeyleri ne şekilde etkilediğini belirlemek mümkün olmamıştır. Bu nedenle, bu bileşenlerin fonksiyonel deneylerden elde ettiğimiz yanıtlara katkısı yorumlanamamıştır. Sonuç olarak, sakubitril/valsartan kombinasyonunun diabetik kalpte kasılma ve gevşeme yanıtlarına aracılık eden yollar ve bileşenler üzerine etkisinin anlaşılabilmesi için daha kapsamlı moleküler çalışmalar yapılması yararlı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Diabet, Kalp, Protein ifadenmesi, Sakubitril, Valsartan

The effect of Sacubitril/Valsartan combination on protein expression of some components of contraction-relaxation pathway in the diabetic heart

Diabetes is a chronic, endocrine disorder which occurs due to reduced insulin secretion and/or insulin sensitivity. Cardiovascular complications are the major cause of diabetes-related morbidity and mortality. Increased renin-angiotensin-aldosterone system activity and reduced beta adrenergic receptor (β -AR) responsiveness are the important factors which contribute to diabetic cardiac dysfunction. In addition to the drugs which regulate glucose homeostasis, it is crucial to develop new drugs for the treatment of diabetes-related cardiac complications. Sacubitril/valsartan is a 1:1 combination of sacubitril, a neprilysin inhibitor, and valsartan, an angiotensin receptor blocker. The drug has been approved for the treatment of heart failure and its beneficial effects on diabetic heart have been shown in the preclinical studies. However, underlying mechanism of these beneficial effects still remains to be clarified. Moreover, there isn't any study which investigates the possible effects of sacubitril/valsartan on contraction and relaxation responses in the diabetic heart. From this point of view, we aimed to investigate the effect of sacubitril/valsartan combination on protein levels of β_1 -, β_2 -, β_3 -ARs and other downstream pathway components which mediate contraction and relaxation by using Western blot technique. Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Multiple comparisons were performed one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. $p < 0.05$ was considered as statistical significance. Reduced protein expression of SERCA2a and p-PLN/PLN has been found in the diabetic heart. Neither sacubitril/valsartan nor valsartan treatment did not improve the protein expression of these components which are responsible for cardiac relaxation. This result shows that both treatment approaches do not have any beneficial effect on cardiac diastolic dysfunction seen in type 2 diabetes model. Changes in the protein expression of β_1 -, β_2 -, β_3 -ARs and eNOS and p-eNOS due to diabetes or treatment approaches could not be determined in the present study. Therefore, we were unable to evaluate the possible contribution of these components to our functional data. In conclusion, comprehensive molecular experiments may help to understand the effect of sacubitril/valsartan on contractile/relaxant pathway and components in the diabetic heart.

Keywords: Diabetes, Heart, Protein expression, Sacubitril, Valsartan

II. Amaç ve Kapsam

Diabet, pankreastan insülin salıverilmesinde ve/veya dokuların insüline duyarlılığında azalmaya bağlı olarak ortaya çıkan kronik ve endokrin bir hastalıktır. Diabetin dünya genelinde görülme sıklığı her geçen gün artmaktadır. Diabet ve komplikasyonlarına bağlı ölümler, tüm dünyada ilk 10 ölüm nedeni arasında yer almaktadır (IDF, 2019). Diabetik bireylerin yaklaşık 1/3'ünde kardiyovasküler hastalıklar görülmektedir ve bu hastalıklara bağlı olarak gelişen komplikasyonlar diabetik bireylerde en sık rastlanan ölüm nedenidir (Einarson ve ark., 2018). Diabetik kardiyomiopati, kalp kapakçığı hastalıkları, koroner arter hastalığı ve hipertansiyondan bağımsız olarak meydana gelen, kalpte yapısal değişikliklere bağlı olarak vücuda yeterince kan pompalanamaması ile sonuçlanan bir kalp hastalığıdır (Jia ve ark., 2018). Diabetik kardiyomiopatinin oluşmasında rol oynayan mekanizmalar arasında, artmış renin-angiotensin-aldosteron sistem (RAAS) aktivasyonu (Sivasankar ve ark., 2018) ve artmış sempatik sinir sistemi (SSS) aktivitesine bağlı olarak, β -adrenerjik reseptör (AR) sinyal iletim mekanizmalarında meydana gelen değişiklikler yer almaktadır (Varma ve ark., 2018). Diabetik kardiyomiopatinin ilerleyen aşamalarda kalp yetmezliğine yol açtığı bilinmektedir (Palomer ve ark., 2018). Kalp yetmezliğinde RAAS ve SSS hastalığın ilerleyişini kötüleştirmekteyken natriüretik peptid (NP) sistemi aktive olarak, kalp yetmezliği patofizyolojisinde koruyucu rol oynamaktadır (Singh ve ark., 2017).

Kalp dokusunda bulunan β_1 - ve β_2 -AR'ler temel olarak pozitif inotropik ve kronotropik etkilere yol açarken, β_3 -AR'ler kalpte negatif inotropik etkiye aracılık etmektedir (Gauthier ve ark., 1996). β_1 - ve β_2 -AR'lerin her ikisi de Gs proteini ile kenetlidir. Agonistin bağlanmasını takiben Gs α alt birimi ikincil ulak adenilil siklazı (AS) aktive eder, hücre içinde siklik adenozin 3',5'-monofosfat (cAMP) miktarı artar ve protein kinaz A (PKA) aktive olur. Aktive olan PKA, L tipi Ca^{++} kanalı ve birçok proteinin fosforillenmesini sağlayarak kalpte β -AR aracılı kasılma yanıtının oluşmasına aracılık eder (Brodde ve Michel, 1999). L tipi Ca^{++} kanalının fosforilasyonu sonucu hücre içine Ca^{++} girişi gerçekleşir ve hücre içinde Ca^{++} miktarının artması sonucu sarkoplazmik retikulumdan (SR) Ca^{++} -aracılı- Ca^{++} -salınımı ile, kardiyomiyositlerde kasılma yanıtı başlamış olur (George ve Pitt, 2006). PKA tarafından SR Ca^{++} ATPaz (SERCA2a) üzerinde inhibitör özellik gösteren fosfolambanın (PLB) fosforillenmesi ile sitozoldeki Ca^{++} , SR'ye geri alınır ve bunun sonucunda gevşeme yanıtı başlar (Kaumann ve Molenaar, 1997).

β_2 -AR'ler, β_1 -AR'lerin aksine aynı zamanda Gi proteini ile de kenetlidir. Gi proteini aracılı yolağın uyarılması, cAMP miktarı ve buna bağlı PKA aktivasyonunda azalmaya neden olduğu için kardiyak kontraktileti olumsuz yönde etkilemektedir (Woo ve Xiao, 2012). Bunun yanı sıra, β_2 -AR'ler Gi proteini aracılı fosfotidilinositol-3-kinaz (PI3K) ve protein kinaz B (Akt) yolağının aktive olmasına yol açarak apoptozisi inhibe etmekte ve kardiyoprotektif etki göstermektedir (Zhu ve ark., 2001). β_3 -AR'ler ise β_1 - ve β_2 -AR'lerden farklı olarak Gi/o α proteini ile kenetlidir. Agonist bağlanması sonucu aktive olan Gi/o α alt birimi, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ifadenmesini uyarır. eNOS aracılı oluşan nitrik oksit (NO), ikincil ulak guanilil siklazı (GS) aktive eder ve hücre içi siklik guanozin 3',5'-monofosfat (cGMP) miktarı artar. Artan cGMP, protein kinaz G (PKG) aktivasyonuna neden olur. PKG, L tipi Ca⁺⁺ kanalından hücre içine Ca⁺⁺ iyon akımında azalmaya neden olarak kasılma yanıtını negatif yönde etkilemekte ve gevşeme yanıtına neden olmaktadır (Rozec ve Gauthier, 2006). β_3 -AR'lerin, kalp yetmezliği gibi SSS aktivasyonunun arttığı patofizyolojik durumlarda ifadenme düzeyinin arttığı ve kalbi koruduğu düşünülmektedir (Kayki-Mutlu ve ark., 2019).

Diabetik kalpte β -AR ifadenme düzeyindeki değişim ilk defa 70'li yılların sonunda kanıtlanmıştır. Streptozotosin (STZ) diabetik sıçanlarda kalp atım hızında %24 azalmaya paralel olarak kardiyak β -AR ifadenmesinde %28 azalma olduğu gösterilmiştir (Savarese ve Berkowitz, 1979). STZ diabetik sıçanlarda kalp dokusunda β_1 - ve β_2 -AR'lerin protein düzeyinin azaldığı β_3 -AR'lerin ise arttığı gösterilmiştir (Dinçer ve ark., 2001; Bidasee ve ark., 2008). Zucker obez sıçanlar ve yüksek yağlı diyet + düşük doz STZ ile oluşturulan tip 2 diabetik sıçanlarda kalpte kasılma yanıtı/atım hızındaki azalma β_1 - ve β_2 -AR protein ifadenmesindeki azalmayla ilişkili bulunmuş, β_3 -AR protein miktarında ise değişme olmadığı gösterilmiştir (Haley ve ark., 2015a; Jiang ve ark., 2015). Genetik tip 2 diabet modeli olan ZDF sıçanlarda ise kalbin kasılabilirliği değişmezken, kalp atım hızı azalmıştır. Bu çalışmada β_1 - ve β_2 -AR protein miktarının azaldığı ve kalpte koruyucu etkilere aracılık ettiği düşünülen β_3 -AR protein miktarının ise arttığı gösterilmiştir (Haley ve ark., 2015b). Çalışma grubumuz tarafından da diabette kardiyak β_3 -AR protein ifadenmesinin arttığı tip 1 diabetik sıçanlarda gösterilmiştir (Arioglu-Inan ve ark., 2013). Bununla birlikte, farelerde yüksek yağlı diyetle oluşturulan tip 2 diabet modelinde izoprenalinle (selektif olmayan β -AR agonist) uyarılan kasılma ve gevşeme yanıtlarında azalmaya rağmen, β_1 - ve β_2 -AR protein ifadenmesinde anlamlı bir değişim olmadığı gözlenmiştir (Fu ve ark., 2017; Wang ve ark., 2017). Bu veriye paralel olarak genetik tip 2 diabetik db/db farelerde de azalmış β -AR aracılı yanıtı rağmen β_1 -AR protein miktarı değişmemiştir (Daniels ve ark., 2010). Bu durumun, diabetik kalpte β -AR protein ve/veya

mRNA düzeyinde değişiklik olmaksızın, β -AR aracılı yanıtların oluşmasında rol oynayan alt yolak bileşenlerinde meydana gelen değişimlerden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Lamberts ve ark., 2014).

Diabette dolaşımda yüksek kan şekeri düzeyine bağlı olarak kan volümünün azalması, böbrekte arteriyel kan basıncında düşüőe neden olur. Bunun sonucunda düşen kan basıncını düzenlemek üzere RAAS aktive olur ve anjiyotensin II (Ang-II) oluşumu artar (Sivasankar ve ark., 2018). Diabette artan oksidatif stres, dolaşımda ve dokularda Ang-II miktarının artmasına neden olan bir diğer faktördür (Lim ve ark., 2004). Diabetik kalpte Ang-II reseptör ve mRNA ifadenmesinin arttığı gösterilmiştir (Boudina ve Abel, 2007). Kalp dokusunda artan Ang-II miktarı, insülin rezistansını ve oksidatif stresi artırarak endotel disfonksiyonuna yol açar (Sivasankar ve ark., 2018). Bunun yanı sıra, Ang-II miktarı arttığında reaktif oksijen ürünleri oluşur ve/veya doğrudan anjiyotensin 1 reseptörü (AT1R) aracılığı ile hipertrofi ve fibrozise neden olur (Bader, 2010). Diabette, artan Ang-II miktarına bağlı olarak ortaya çıkan bu etkiler diabetik kardiyomiyopatinin gelişmesine ve ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (Sivasankar ve ark., 2018). RAAS'yi hedef alan ilaçlardan olan anjiyotensin reseptör blokerleri (ARB), Ang-II'nin AT1R'ye bağlanmasını önleyerek kalp üzerindeki istenmeyen etkilerin oluşmasını önlemektedir (Tamargo ve Tamargo, 2017). Diabete bağlı gelişen kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde bu ilaç grubunun yararlı etkileri hem prelinik hem de klinik çalışmalarla gösterilmiştir. Tip 1 diabetik sıçanlarda losartan (ARB) ve kandesartanın (ARB) kalp fonksiyonu üzerindeki koruyucu etkileri Ca^{++} homeostazını iyileştirmeleri ile ilişkilendirilmiştir (Liu ve ark., 2006; Yaras ve ark., 2007). Bunun yanı sıra, hem tip 2 hem de tip 1 diabetik sıçanlarda irbesartan (ARB) ile valsartanın (ARB) kardiyak *remodeling*i azalttıkları ve kalp fonksiyonunu iyileştirdikleri gösterilmiştir (Liu ve ark., 2015; Wu ve ark., 2011). *The Candesartan in Heart Failure—Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity Program* (CHARM) klinik çalışmasında bir ARB olan kandesartanın diabetik bireylerde kardiyovasküler hastalık gelişmesinde koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Yusuf ve ark., 2005). *The Valsartan Antihypertensive Long-term Use Evaluation* (VALUE) klinik çalışmasında ise valsartan (ARB) tedavili grupta, yeni başlayan diabet tablosunun %23 daha az görülmesi, valsartanın glukoz metabolizması üzerinde olumlu etkisi olduğunun bir göstergesidir (Julius ve ark., 2004).

NEP enzimi, kardiyovasküler sistem, sinir sistemi ve immün sistemde düzenleyici rol oynayan NP'ler, bradikinin, adrenomedullin, endotelin I, Ang-I, Ang-II'nin de içinde bulunduğu birçok

peptidin metabolizmasında görev almaktadır (McMurray ve ark., 2014; Turner ve ark., 2001; Turner ve ark., 2002). Vazodilatör etkili NP'lerin NEP enzimi aracılığıyla yıkılmaları, enzimi inhibe eden tedavi yaklaşımlarının kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yararlı etkileri olabileceğini düşündürmektedir (McDowell ve Nicholls, 2000). NEP enzimi hem vazodilasyona hem de vazokonstrüksiyona yol açan peptidlerin metabolizmasında rol aldığı için, tedavide bu enzimi inhibe eden bileşiklerin RAAS üzerinde inhibitör özellik gösteren bileşiklerle kombine olarak kullanılması fikrini gündeme getirmiştir (Kang ve Banerjee, 2017). Yapılan çalışmalarda, NEP enzim inhibitörlerinin (NEPi) Ang-I'den Ang-II oluşumunu engelleyen ACE enzim inhibitörleriyle kombine edildiğinde anjiyoödem riskini artırdığı gösterilmiştir (Kostis ve ark., 2004; Packer ve ark., 2002). Bu durum, NEPi'lerin RAAS'yi inhibe eden fakat anjiyoödem riskini artırmayan ARB'ler ile kombine edilmesi fikrinin ortaya çıkmasına neden olmuştur (Gu ve ark., 2010). NEP enzim inhibisyonunun kardiyovasküler sistem üzerindeki etkilerinin yanı sıra obezite ve diabette β hücre fonksiyonunu, glukoz metabolizmasını ve insülin duyarlılığını iyileştirdiği ortaya konulmuştur (Arbin ve ark., 2003; Jordan ve ark., 2017; Seferovic ve ark., 2017; Wu ve ark., 2010).

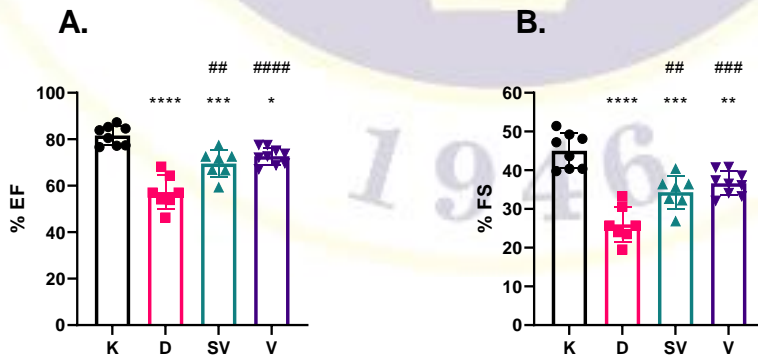
Bir NEPi olan sakubitril ve bir ARB olan valsartanın 1:1 kombinasyonu olan ve LCZ696 adıyla da bilinen ilaç, anjiyotensin reseptör blokeri-neprilisin inhibitörü (ARNi) ilaç grubunun ilk üyesidir (Vardeny ve ark., 2013). Sakubitril/valsartan kombinasyonu, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 2015 yılında düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliğinin (HF_rEF) tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır (FDA, 2015). Ejeksiyon fraksiyonu korunmuş kalp yetmezlikli (HF_pEF) hastalarda yapılan *Prospective comparison of ARNI with ARB on Management of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction* (PARAMOUNT) klinik çalışmasında, sakubitril/valsartan kombinasyonunun etkinliği bileşiğin içeriğindeki valsartanla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Kombinasyon tedavisinin sol atrium boyutunda daha fazla azalmaya neden olduğu ve böylece *remodeling*i tersine çevirdiği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, sakubitril/valsartan kombinasyonu kan basında 9,3/4,9 mmHg (sistolik/diyastolik) azalmaya yol açarken bu oranın tek başına valsartan kullanan hastalarda 2,9/2,1 mmHg olduğu bildirilmiştir (Solomon ve ark., 2012). Yüksek tuz diyeti uygulanan, spontan hipertansif sıçanlarda sakubitril/valsartan kombinasyonu (60 mg/kg), hem kan basıncını daha etkili bir şekilde düşürmüş hem de koroner arter *remodeling*ini, vasküler endotelial disfonksiyonu, kardiyak hipertrofiyi ve inflamasyonu tek başına valsartan (30 mg/kg) tedavisinden daha çok iyileştirmiştir (Kusaka ve ark., 2015). Sıçanlarda izoprenalin uygulaması ile diyastolik disfonksiyon ve kardiyak hipertrofi modeli oluşturulan diğer bir çalışmada ise yedi gün boyunca

uygulanan sakubitril/valsartan kombinasyonu (60 mg/kg) ve valsartan (30 mg/kg)'in hipertrofi üzerinde herhangi bir etkisi gözlenmezken, kombinasyon tedavisi fibrozisi inhibe etmiştir (Miyoshi ve ark., 2019). Sakubitril/valsartanın kalp üzerindeki etkisi HF_{rEF}'li diabetik farelerde valsartanla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Sakubitril/valsartan, TGF- β mRNA ifadenmesini baskılayarak fibrozi tek başına valsartan tedavisine kıyasla daha çok azaltmış ve kalp fonksiyonunu iyileştirmiştir (Suematsu ve ark., 2016). Bir diğer ARNi olan irbesartan/tiorfan, diabet oluşturulan TGR(mRRN2)27 (Ang-II bağımlı hipertansyon modeli) sıçanlarda kan basıncını tek başına irbesartan tedavisiyle aynı oranda düşürmesine karşın proteinüriyi, glomerulosklerozisi ve kalp ağırlığını azaltması açısından daha üstün bulunmuştur (Roksnoer ve ark., 2016). Sakubitril/valsartan kombinasyonunun diabetik kalp üzerindeki etkileri hem diabetik farelerde hem yüksek glukoz maruz bırakılan H9c2 kardiyomyoblast hücre hattında incelenmiştir. İlacın oksidatif stresi, apoptozisi ve kardiyak inflamasyonu azaltarak diabetik kardiyomiyopatiyi iyileştirdiği gösterilmiştir (Ge ve ark., 2019). Literatürde sakubitril/valsartan kombinasyonunun diabetik kalpteki etkilerini araştıran sınırlı sayıda prelinik çalışma bulunmaktadır ve şimdiye kadar gösterilen olumlu etkilerin hangi alt mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştiğinin aydınlatılması gerekmektedir.

Diabetik hastalarda kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılacak ilaçlar için hazırlanmış bir tedavi kılavuzu bulunmamaktadır. Her ne kadar bazı diabet ilaçlarının (metformin, sodyum glukoz ko-transporter-2 (SGLT-2) inhibitörleri ve bazı GLP-1 reseptör agonistleri) kardiyovasküler komplikasyonlar üzerindeki olumlu etkileri gösterilmiş olsa da, diabetik bireylerde gözlenen semptomatik kalp yetmezliğinin tedavisinde ilk basamak tedavi seçeneği RAAS'yi hedef alan ilaçlardır (Kenny ve Abel, 2019). Bununla birlikte, hem RAAS'yi hedef alan hem de NEP enzimini bloke ederek dolaşımda NP seviyesini artıran ARNi'lerin diabetik bireylerde gözlenen kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde umut vaad eden bir tedavi seçeneği olduğu düşünülmektedir (Kenny ve Abel, 2019; Malek ve Gaikwad, 2017). Diabetik birey sayısının dünya genelinde her geçen gün katlanarak arttığı ve tip 2 diabetik bireylerin yaklaşık %70'inin kardiyovasküler hastalıklar nedeniyle hayatını kaybettiği (Silverthorn, 2016) düşünüldüğünde diabetik kardiyak disfonksiyona yönelik yeni ve etkili tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi ve etki mekanizmalarının aydınlatılması büyük önem arz etmektedir. Hem NEPi'lerin hem de ARB'lerin kalpte ve diabetteki olumlu etkileri düşünüldüğünde sakubitril/valsartan kombinasyonunun diabete bağlı gelişen kardiyomiyopatinin tedavisinde kullanılması akla yatkın görünmektedir. Diabetik kalpte kasılma ve gevşeme yanıtlarının bozulduğu bilinmektedir ve şu ana kadar ilacın diabetik

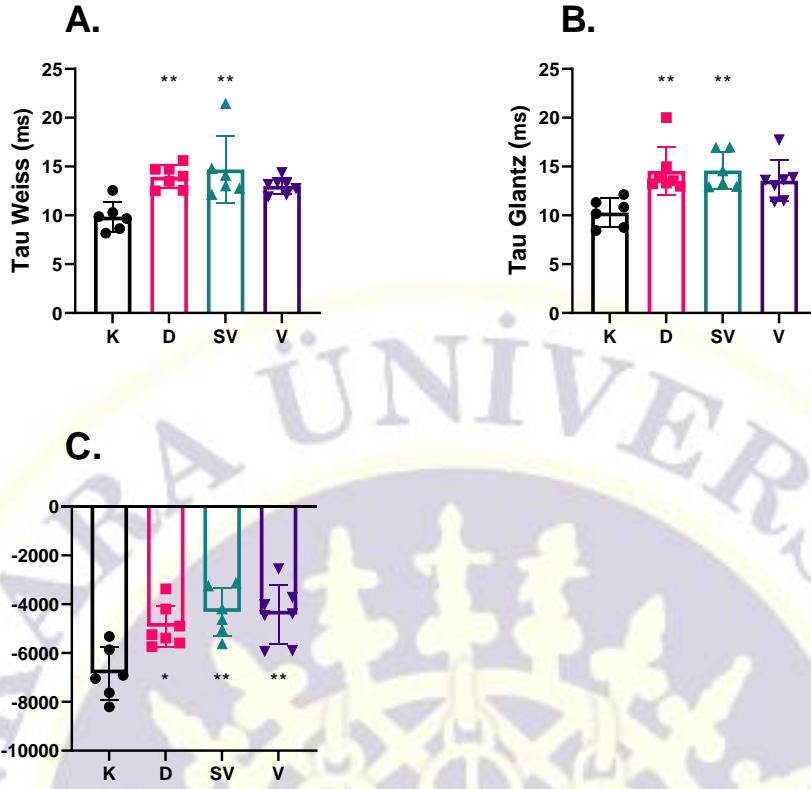
kalpteki kasılma yanıtları üzerine etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

Araştırma grubumuz tarafından yapılan çalışmada literatürde ilk defa, ARNi grubunun ilk üyesi olan sakubitril/valsartanın kardiyovasküler komplikasyonlar üzerine β -AR yanıtverirlik üzerinden etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla sıçanlarda yüksek yağlı diyet ve düşük doz STZ injeksiyonu ile tip 2 diabet modeli oluşturulmuş ve ilacın etkinliği içeriğinde bulunan valsartanla karşılaştırmalı olarak hem *in vivo* hem de *in vitro* deneylerle değerlendirilmiştir. Ekokardiyografi deneylerinde sakubitril/valsartan kombinasyonunun valsartana herhangi bir üstünlüğü bulunmaksızın, kalbin sistolik fonksiyonunun belirteçlerinden olan % ejeksiyon fraksiyonu (%EF) ve % fraksiyonel kısılmayı (%FS) iyileştirdiği gösterilmiştir (Şekil 1). PV loop kateterizasyon deneylerinde kalbin diyastolik fonksiyon belirtilerinden olan gevşeme hızı diabette anlamlı olarak azalmış, buna karşın tedavi yaklaşımları ile düzelmemiştir. Bir diğer diyastolik fonksiyon Tau gevşeme sabiti değerleri diabetik kalpte beklenildiği gibi anlamlı olarak artmış ve yalnızca valsartan tedavisi uygulanan grupta belli oranda düzelmiştir (Şekil 2). *In vitro* papiller kas sisteminde, izoprenalinle uyarılan β_1 - ve β_2 -AR aracılı kasılma yanıtının diabette belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir. Her iki tedavi yaklaşımıyla kasılma yanıtı belirli ölçüde düzelmiş olsa da, veriler arasındaki yüksek standart sapmadan dolayı bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 3). *In vitro* Langendorff kalp preparasyonu deneylerinde ise diabette selektif agonist CL-316,243 ile elde edilen β_3 -AR aracılı yanıtın kontrole kıyasla hafif körelendiği, bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Diabette anlamlı bir değişim bulunmadığı için de tedavi yaklaşımlarının etkisini değerlendirmek mümkün olmamıştır (Şekil 4). (Önceki çalışmaya ait veriler henüz yayınlanmamış olup, tüm hakları tarafıma aittir).



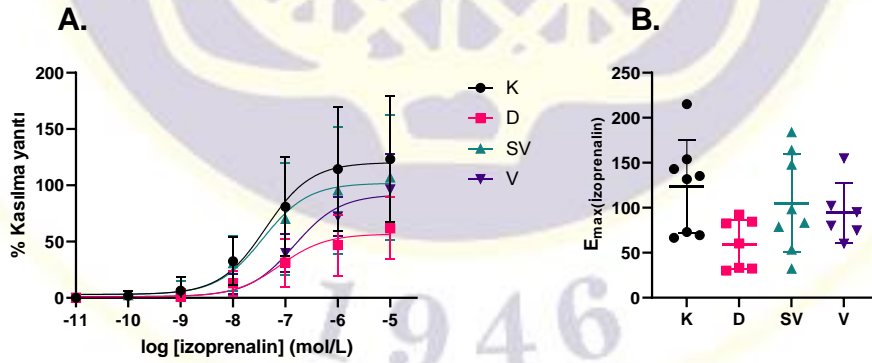
Şekil 1. *In vivo* ekokardiyografi sistolik fonksiyon parametreleri

A. % EF, ejeksiyon fraksiyonu; **B.** % FS, fraksiyonel kısılma. K, Kontrol (n=8); D, Diabetik (n=7); SV, Sakubitril/valsartan tedavili diabetik (n=7); V, Valsartan tedavili diabetik (n=9). *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; ****, p<0,0001 kontrole göre anlamlılık. ##, p<0,01; ###, p<0,001 diabete göre anlamlılık.



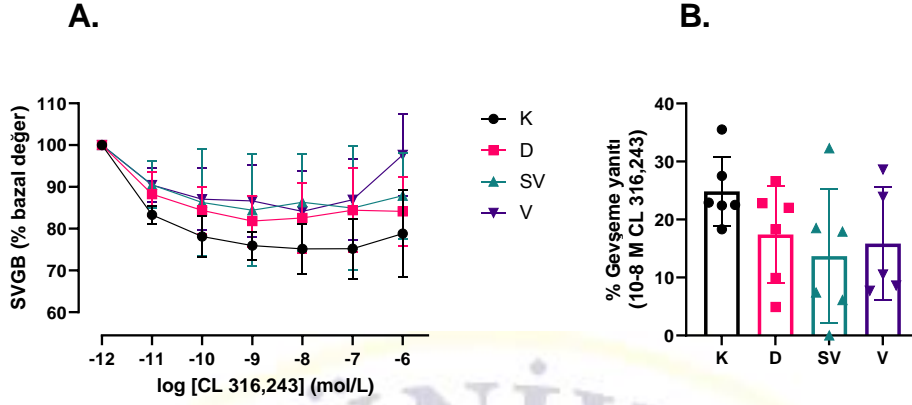
Şekil 2. *In vivo* PV loop diyastolik fonksiyon parametreleri

A. ve **B.** Tau, izovolumik gevşeme sabiti; **C.** dP/dt_{min}, gevşeme hızı. K, Kontrol (n=6); D, Diabetik (n=7); SV, Sakubitril/valsartan tedavili diabetik (n=6); V, Valsartan tedavili diabetik (n=7). *, p<0,05; **, p<0,01 kontrole göre anlamlılık.



Şekil 3. Papiller kasta izoprenalinle elde edilen kasılma yanıtları

A. Papiller kasta elde edilen kümülatif izoprenalin doz yanıt eğrisi (10^{-10} - 10^{-5} M). **B.** Efikasite (E_{max}) değerleri. K, Kontrol (n=8); D, Diabetik (n=7); SV, Sakubitril/valsartan tedavili diabetik (n=8); V, Valsartan tedavili diabetik (n=6).



Şekil 4. Langendorff kalp preparasyonunda CL316,243 ile elde edilen gevşeme yanıtları

A. SVGB, sol ventrikül içi gelişen basınç; **B.** 10^{-8} M CL 316,243 ile elde edilen % gevşeme yanıtı. K, Kontrol (n=6); D, Diabetik (n=6); SV, Sakubitril/valsartan tedavili diabetik (n=6); V; Valsartan tedavili diabetik (n=5).

Bu projede, önceki çalışmadan elde edilen *in vivo* ve *in vitro* sonuçların moleküler deneylerle desteklenmesi amaçlanmıştır. Sakubitril/valsartan kombinasyonunun β -AR aracılı yanıtlar üzerindeki etkilerini hangi sinyal yollarını etkileyerek gösterdiğinin Western blot deneyleri yardımıyla protein seviyesi düzeyinde valsartanla karşılaştırmalı incelenmesi amaçlanmıştır.

III. Materyal ve Yöntem

Western Blot Deneyleri

Bu çalışmada *in vitro* hayvan deneylerinden elde edildikten sonra sıvı azot içerisinde dondurulan ve -80°C 'de saklanan sol ventrikül dokuları kullanılmıştır. (Kontrol (K)=5, Diabetik (D)= 5, Sakubitril/valsartan tedavili diabetik (SV)=5, Valsartan tedavili diabetik (V)=4). Sol ventrikül dokuları sıvı azot ile toz edilmiş ve içinde RIPA tampon çözeltisi (1 ml), fosfataz inhibitörü sodyum ortovanadat (Na_2VO_3 , 200mM) ve proteaz inhibitör kokteyli (1:100) bulunan dibi konik tüplere alınmıştır. Ultrasonik homojenizatör ile homojenize edildikten sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de iki saat boyunca çalkalanarak ajitasyon sağlanmıştır. Sonrasında örnekler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 12000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi ardından alınan supernatant kısım küçük parçalara (50 μl) bölünmüş ve -80°C 'de saklanmıştır. Lizatların protein miktar tayinleri Bikinkoninik asit (BCA) yöntemi ile yapılmıştır.

Miktar tayini yapılan lizatların üzerine Laemmlı (6X) çözeltisi, her örnekte eşit miktarda protein olacak miktarda eklenip 37°C 'de 30 dk ısıtılarak protein denatürasyonu sağlanmıştır ve yükleme aşamasına kadar örnekler -20°C 'de saklanmıştır.

Elektroforezde kullanılan jellerin konsantrasyonu çalışılan proteinin ağırlığına göre belirlenmiştir. Bu amaçla çalışmamızda genel olarak %10 konsantrasyonda hazırlanmış jel kullanılmıştır. Elektroforezde işleminde kullanılan jeller örneklerin yüklendiği yükleme jeli (Çizelge 1) ve örneklerin molekül ağırlığına göre ayrılmasını sağlayan ayırıcı jel (Çizelge 2) olmak üzere hazırlanmıştır.

Örneklerin jele yüklenmesinin ardından 30 dk boyunca 30 Volt (V)'ta, 90 dk boyunca 120 V'de elektroforez işlemi ile yüklenen örneklerin jelde molekül ağırlıklarına göre ayrılmaları sağlanmıştır.

Çizelge 1. Yükleme jel formülasyonu

	Yükleme jeli; 1,5 mm;2 jel için
	(ml)
Bidistile su	5,895
Tris/SDS (1,5 M, pH 6,8)	2,34750
Akrilamid/bisakrilamid (%30:%0,8)	1,03125
APS (%10)	0,09375
TEMED	0,00938

Çizelge 2. Ayırıcı jel formülasyonu

	Ayırıcı jel; 1,5 mm;2 jel için
	%10 (ml)
Bidistile su	8,74
Gliserol	0,56
Tris/SDS (1,5 M, pH 8,8)	5,63
Akrilamid/bisakrilamid (%30:%0,8)	7,50
APS (%10)	0,11
TEMED	0,01

Fosfolamban (PLN) ve fosforile fosfolamban (p-PLN) proteinleri küçük molekül ağırlıklı proteinlerdir. Bu nedenle bu proteinlerin tayininde kullanmak için klasik jel formülasyonları ve elektroforez tampon çözeltileri elverişli değildir. PLN ve p-PLN protein tayini için, elde edilen lizatların üzerine trisin yükleme çözeltisi (2x) her örnekte eşit miktarda protein olacak miktarda eklenmiş ve 100°C'de beş dk ısıtılarak protein denatürasyonu sağlanmıştır. Numunelerin yüklenmesi için trisin jeli (Çizelge 3 ve Çizelge 4) ve elektroforez için 1X anot/katot tampon çözeltileri (Çizelge 5 ve Çizelge 6) kullanılmıştır.

Çizelge 3. Trisin yükleme jel formülasyonu

	Yükleme jeli; 1,5 mm;2 jel için
	%4 (ml)
Bidistile su	6,224
Gliserol	6,224
Tris.Cl/SDS (1,5 M, pH 6,8)	2,48
Akrilamid/bisakrilamid(%30:%0,8)	1,296
APS (%10)	0,09375
TEMED	0,00938

Çizelge 4. Trisin ayırıcı jel formülasyonu

	Ayırıcı jel; 1,5 mm;2 jel için
	%10 (ml)
Bidistile su	4,69
Gliserol	2,11
Tris.Cl/SDS (3 M, pH 8,45)	6,67
Akrilamid/bisakrilamid(%30:%0,8)	6,53
APS (%10)	0,11
TEMED	0,01

Çizelge 5. Anot tampon çözeltisi formülasyonu

Anot tamponu	10X için
Tris (2 M)	242,2 g
Hidroklorik asit (HCl)	pH:8,9 olana kadar eklenmiştir.
Bidistile su	1 L

Çizelge 6. Katot tampon çözeltisi formülasyonu

Katot tamponu çözeltisi	10X için
Tris (2 M)	121,1 g
Trisin (0,1 M)	179,2 g
SDS (%20)	50 ml
Bisiditile su	1 L'ye tamamlanmıştır.

Elektroforez işlemi sonrasında jeller yükleme tankından çıkarılarak transfer tamponunda (Çizelge 7) yıkanmıştır. Sırasıyla sünger, filtre kağıdı, jel, membran, filtre kağıdı ve sünger üst üste yerleştirilerek sandviç haline getirilmiş ve bu sandviçler transfer kasetlerine

yerleştirilmiştir. İlgili proteine uygun olarak polivinilidin florür (PVDF) veya nitroselüloz (NS) membran kullanılmıştır. Hazırlanan kasetler tanka yerleştirilmiş ve buz kalıbı da konularak, tank taze hazırlanmış transfer tamponuyla doldurulmuştur. Transfer işlemi magnetik karıştırıcı üzerinde ve soğukta gerçekleştirilmiştir. Yüklenen protein miktarına göre transfer işlemi 100 V'de iki saat (10 µg protein), üç saat (45 µg protein) veya dört saat (100 µg protein) yapılmıştır. Bu işlem sayesinde jelde yürütülen örneklerin membrana transferi sağlanmıştır.

Çizelge 7. Transfer tampon çözeltisi formülasyonu

Transfer tamponu	1000 ml için
Tris	2,9 g
Glisin	14,5 g
Distile su	800 ml
Metanol	200 ml

Transfer işlemi sonunda membranlar %1 Tween20 içeren 1X trisle tamponlanmış salin (TBS) çözeltisi (TBST) ile bes dk yıkandıktan sonra spesifik olmayan antikor bağlanmalarını önlemek için %5 bovine serum albümin (BSA) içeren TBST ile çalkalayıcı üzerinde bir saat boyunca oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Bloklama işlemi tamamlanan membranlar, TBST çözeltisi ile oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde üç kez 10'ar dk süreyle yıkanmıştır.

Çalışılan proteine uygun olarak seçilen primer antikor %5 BSA içeren TBST içinde belirlenen dilüsyonda (Çizelge 8) hazırlanmıştır. Membranlar primer antikor ile +4°C'de gece boyu çalkalanmıştır. Ertesi gün membranlar primer antikor çözeltisinden alınıp TBST çözeltisi ile oda sıcaklığında üç kez 10'ar dk süreyle çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır.

Çizelge 8. Primer antikorlar ve dilüsyonları

Primer antikor	Dilüsyon
GAPDH (CST2118S, Cell signaling)	1/5000
SERCA2a (CST4388, Cell signaling)	1/2000
PLN (CST8495, Cell signaling)	1/2000
p-PLN (PLN ^{ser16/thr17}) (CST8496, Cell signaling)	1/1000
β ₁ (ab3442, Abcam)	1/500
β ₂ (ab176490, Abcam)	1/500
β ₃ (ab59685, Abcam)	1/500
eNOS (PA1-037, Thermo Fisher)	1/500
p-eNOS (eNOS ^{Ser1177}) (PA517917, Thermo Fisher)	1/500

Çalışılan proteine ve kullanılan primer antikora uygun olan sekonder antikor seçilerek %5 BSA içeren TBST içinde uygun dilüsyonda (Çizelge 9) hazırlanmıştır. Membranlar sekonder antikor ile +4°C’de bir buçuk saat süreyle çalkalanmış, sonrasında TBST çözeltisi ile oda sıcaklığında üç kez 10’ar dk ve ardından bir kez 10 dk TBS çözeltisi ile çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır.

Çizelge 9. Sekonder antikorlar ve dilüsyonları

Sekonder antikor	Dilüsyon
GAPDH (Antirabbit, CST7074, Cell signaling)	1/5000
SERCA2a (Antirabbit, CST7074, Cell signaling)	1/5000
PLN (Antirabbit, CST7074, Cell signaling)	1/2000
p-PLN (PLN ^{ser16/thr17}) (Antirabbit, CST7074, Cell signaling)	1/2000
β_1 (Antirabbit, CST7074, Cell signaling)	1/5000
β_2 (Antirabbit, CST7074, Cell signaling)	1/5000
β_3 (Antichicken, ab97141, Abcam)	1/5000
eNOS (Antirabbit, CST7074, Cell signaling)	1/5000
p-eNOS (Antirabbit, CST7074, Cell signaling)	1/2000

Yıkanan membranların üzerine 1 ml artırılmış kemilüminesans (*enhanced chemiluminescence*, ECL) çözeltisi (reaktif A ve reaktif B’nin 1:1 karışımı ile her seferinde taze olarak hazırlanmıştır) eklenmiştir. Bir dk boyunca, karanlıkta membran bu çözelti ile muamele edilmiştir. ECL uygulanan membranlar kalın şeffaf dosyaya yerleştirilerek kasetin içine konulmuş ve karanlık odada görüntü röntgen filmine basılmıştır. Basma süresi çalışılan proteine göre bir sn - 15 dk arasında uygulanmıştır. Film önce developer çözeltisinde 30-40 sn, sonra fikser çözeltisinde 30-40 sn tutulmuştur. Son olarak, su ile yıkanıp kurutulan filmdeki görüntüler tarayıcıda taranıp, Image J programına aktarılmış ve protein bant yoğunlukları bilgisayarda analiz edilmiştir.

İstatistiksel Analiz

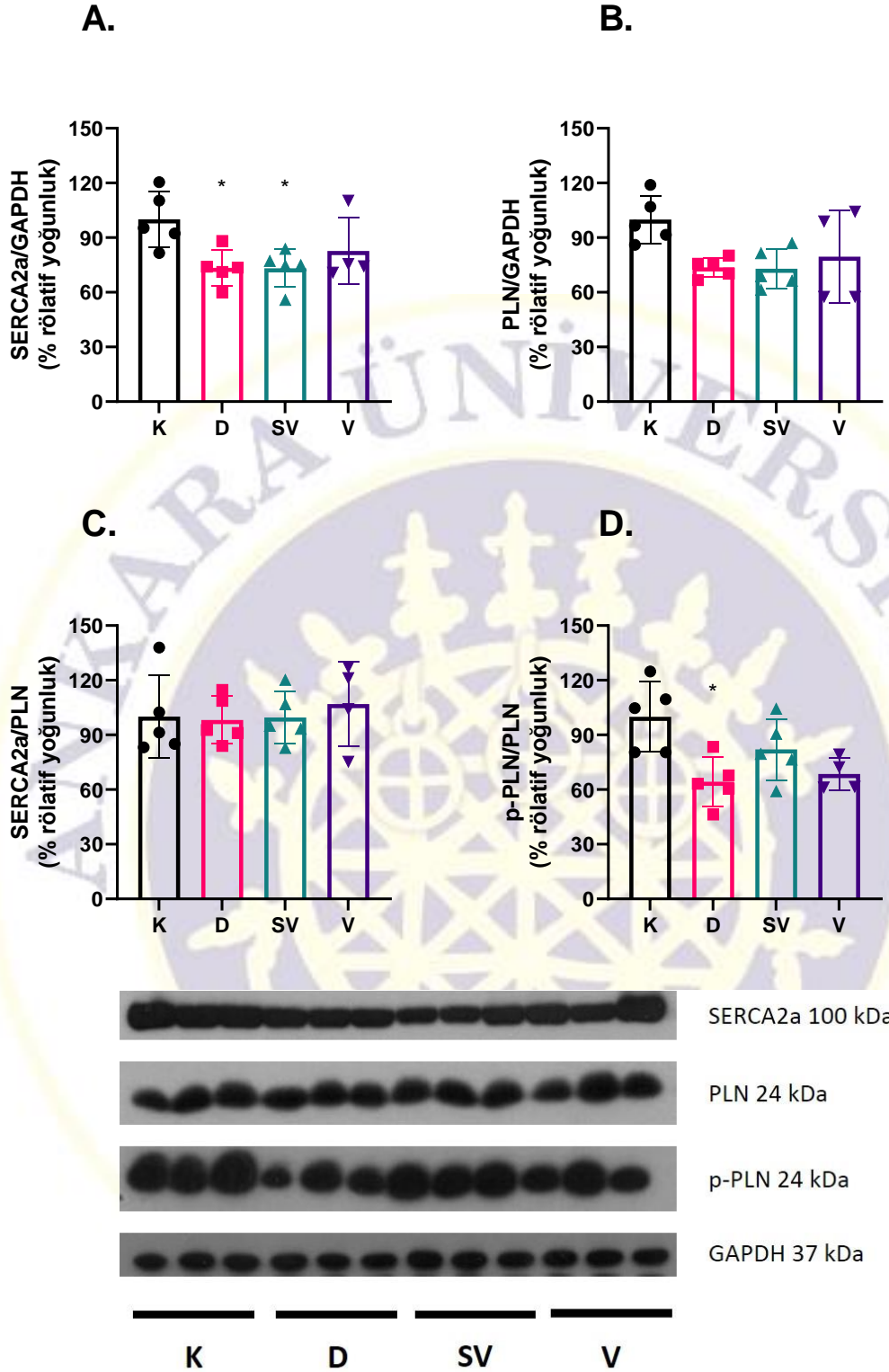
Elde edilen dataların istatistiksel analizi GraphPad Prism® (sürüm 8.3.0) programında yapılmıştır. Dataların dağılımının şeffaf bir şekilde gösterilmesi amacıyla grafikler saçılım (scatter plot) grafiği şeklinde verilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırma tek-yönlü ANOVA ve Bonferroni post-hoc testi ile yapılmış olup, istatistiksel analiz $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir.

IV. Analiz ve Bulgular

SERCA2a, Fosfolamban (PLN) ve Fosforile Fosfolamban (p-PLN) İfadenme Düzeyi

Kalpde diyastolik fonksiyonun önemli bir bileşeni olan SERCA2a ifadenmesi diabetik ve sakubitril/valsartan tedavili grupta anlamlı olarak azalmıştır. Valsartan tedavili grupta ise SERCA2a ifadenmesi düzeyi kontrole oranla azalmış olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmemiştir (K: %100,00 ± 15,38; D: %73,38 ± 10,05; SV: %73,24 ± 10,44; V: %82,75 ± 18,49) (Şekil 5A).

SERCA2a üzerinde inhibitör etkinlik gösteren PLN ifadenme düzeyinde gruplar arasında bir farklılık bulunmamıştır (K: %100,00 ± 13,08; D: %73,68 ± 5,23; SV: %72,96 ± 10,74; V: %79,56 ± 25,52) (Şekil 5B). Öte yandan p-PLN/PLN oranı diabetik grupta kontrole oranla anlamlı olarak azalırken, sakubitril/valsartan tedavili grupta bu oran artsa da kontrol seviyesine ulaşmamıştır (K: %100,00 ± 19,33; D: %64,28 ± 13,40; SV: %82,02 ± 16,83; V: %68,59 ± 8,84) (Şekil 5D). SERCA2a/PLN oranı ise gruplar arasında benzerlik göstermektedir (K: %100,00 ± 22,51; D: %98,21 ± 12,94; SV: %99,62 ± 14,31; V: %106,94 ± 23,26) (Şekil 5C).

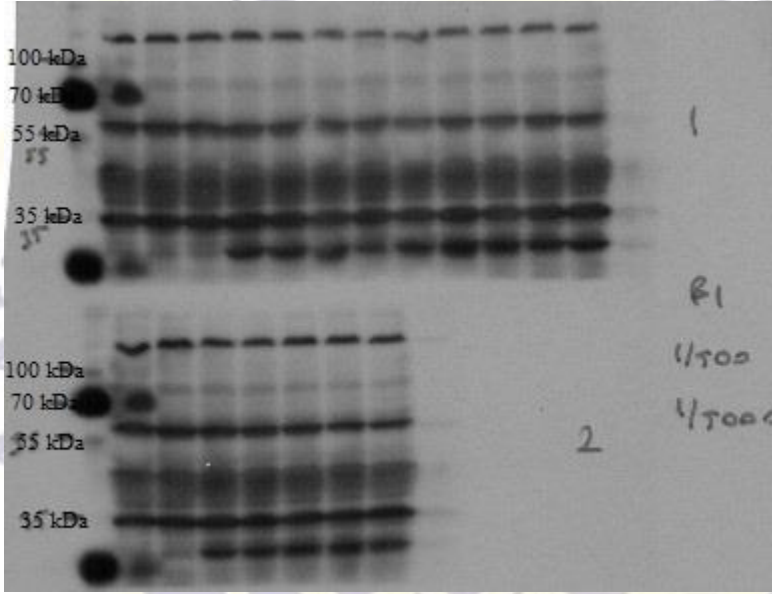


Şekil 5. Kalpte gevşeme yolağı ile ilişkili protein ifadenmeleri

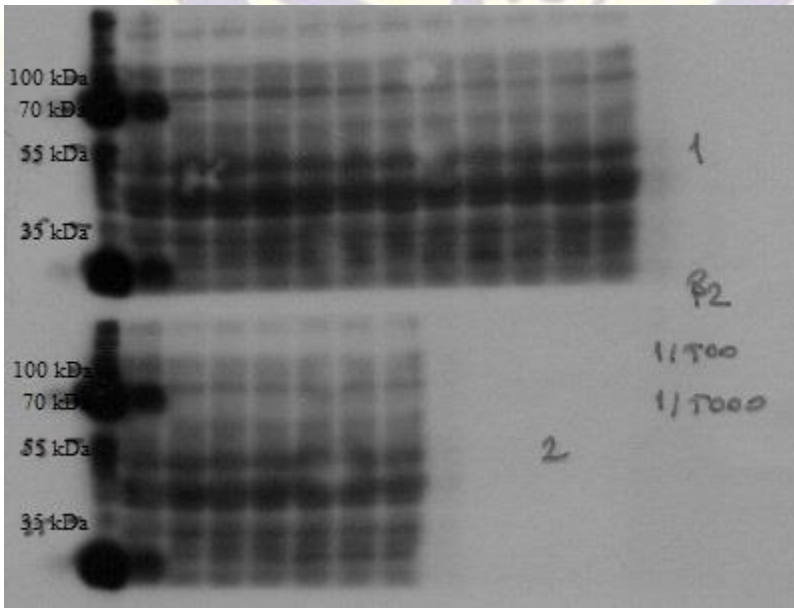
A. SERCA2a protein ifadenme düzeyi. **B.** PLN, fosfolamban protein ifadenme düzeyi. **C.** SERCA2a/PLN, SERCA2a proteinin fosfolambana oranı. **D.** p-PLN/PLN, fosforile fosfolambanın fosfolambana oranı. K, Kontrol (n=5); D, Diabetik (n=5); SV, Sakubitril/valsartan tedavili diabetik (n=5); V; Valsartan tedavili diabetik (n=4). *, p<0,05 kontrole göre anlamlılık.

β_1 -, β_2 -, β_3 - AR ile eNOS ve Fosforile eNOS (p-eNOS) İfadeleme Düzeyi

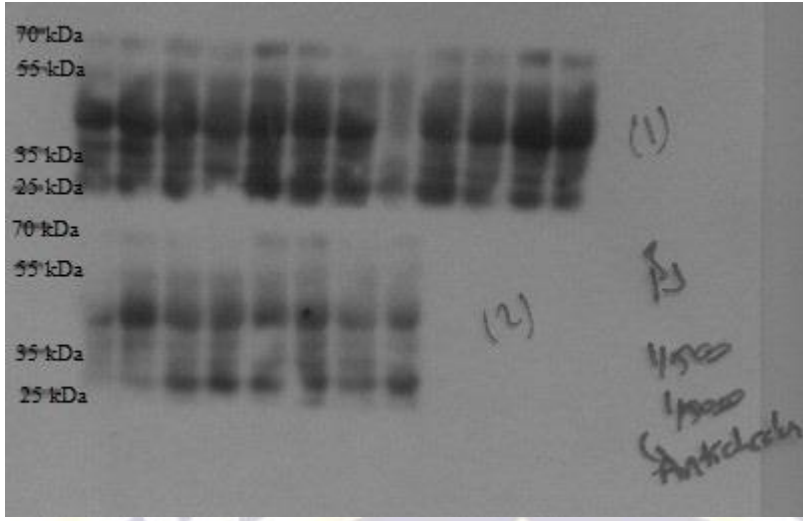
Çalışmamızda β_1 (Şekil 6), β_2 (Şekil 7), β_3 (Şekil 8) antikoru ile yapılan deneyler sonucunda bu antikorumun çok fazla spesifik olmayan bağlanmaya neden olduğu gözlenmiştir. Bu sorunu çözmek amacıyla deney protokolünün farklı aşamalarda defalarca değişiklikler yapılmış, ne var ki spesifik olmayan bağlanmalar her seferinde gözlenmiştir. Bu nedenle elde edilen sonuçların analizini yapmak mümkün olmamıştır. Benzer şekilde eNOS ve fosforile eNOS (p-eNOS) (Şekil 9) antikolarıyla yapılan deneylerde de yapılan tüm modifikasyonlara karşın beklenen noktada protein bandı gözlenmemiştir.



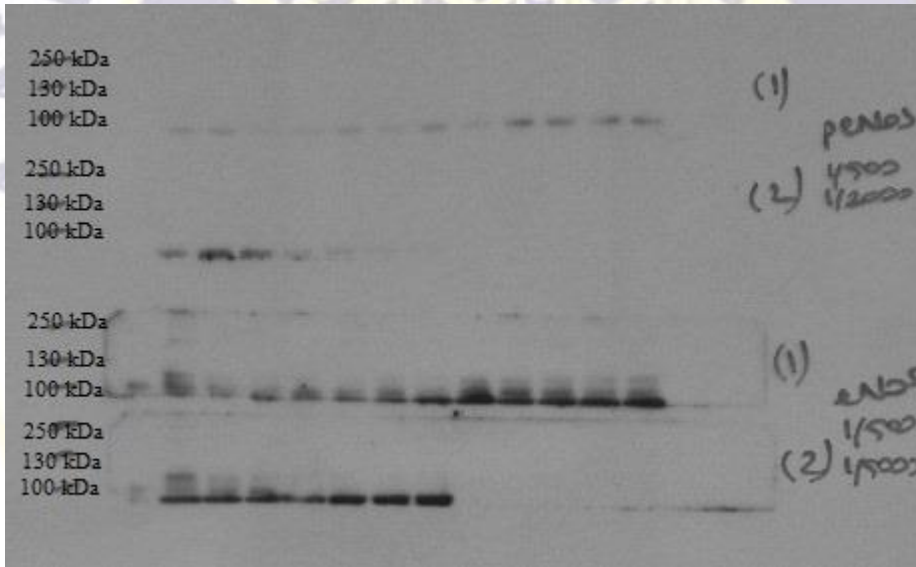
Şekil 6. β_1 (50 kDa) antikoru uygulanmış membran görüntüsü.



Şekil 7. β_2 (47.65 kDa) antikoru uygulanmış membran görüntüsü.



Şekil 8. β_3 (44 kDa) antikorunu uygulanmış membran görüntüsü.



Şekil 9. p-eNOS (140 kDa) ve eNOS (140 kDa) antikorları uygulanmış membran görüntüsü.

V. Sonuç ve Öneriler

Proje kapsamında sakubitril/valsartan kombinasyonunun diabetik kalpte kalpte kasılma ve gevşeme yanıtlarına aracılık eden alt yolak bileşenleri üzerine etkisi protein düzeyinde kombinasyonun içeriğinde bulunan valsartanla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, kalpte kasılma ve gevşeme yolağının önemli bileşenleri olan SERCA2a, PLN ve p-PLN proteinlerinin ifadenme düzeylerindeki değişimler değerlendirilmiştir.

Bununla birlikte, tüm modifikasyonlara rağmen β_1 -, β_2 - ve β_3 -AR'ler ile eNOS ve p-eNOS protein ifadenmelerinin değerlendirilmesi mümkün olmamıştır.

Kalpde sistolik ve diyastolik fonksiyonun sürdürülmesinde Ca^{++} homeostazı önemli role sahiptir (Bers, 2002). Kalpte, β_1 -AR'lerin uyarılması ve PKA aktivasyonunu takiben L tipi Ca^{++} kanallarından hücre içine Ca^{++} girişi, sonrasında da Ryanodin reseptörü (RyR2) ile SR'den sitozole Ca^{++} çıkışı ile kasılma yanıtı oluşur. Bunun yanı sıra, sitozoldeki Ca^{++} 'un SERCA2a ile SR'ye geri alınması gevşeme yanıtının oluşmasında kritik öneme sahiptir (Dhalla ve ark., 1998). Gevşeme yanıtına aracılık eden bu mekanizma SERCA2a ve üzerinde baskılayıcı rolü olan PLN proteininin miktar ve aktivitesi ile yakından ilişkilidir. SERCA2a ifadenmesindeki değişimlerin diyastolik fonksiyonun göstergelerinden olan gevşeme hızı ve Tau gevşeme sabiti parametreleriyle yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. Altı haftalık STZ diabetik sıçanlarda diyastolik fonksiyonun bozulduğu ve bu durumun azalan SERCA2a ifadenmesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Connelly ve ark., 2007). Sekiz ve 12 haftalık tip 1 diabetik sıçanlarda da kardiyak SERCA2a düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (Arioglu-Inan ve ark., 2013; Teshima ve ark., 2000; Zhang ve ark., 2008). Benzer veriler tip 2 diabet modeli oluşturulan çalışmalarda da gözlenmiştir. Spontan tip 2 diabet modeli olan OLETF sıçanlarda kardiyak SERCA2a protein miktarının azaldığı ve diyastolik disfonksiyona katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Takada ve ark., 2012). Çalışmamızda da literatürdeki çalışma sonuçlarına paralel olarak SERCA2a protein ifadenmesinin diabetik kalpte azaldığı bulunmuştur. SERCA2a protein ifadenmesinde gözlenen azalmayı, fonksiyonel verilerden elde ettiğimiz bozulan gevşeme hızı ve Tau gevşeme sabiti değerleri ile ilişkilendirmek akla yatkın görünmektedir. SERCA2a ifadenmesi üzerinde tedavi yaklaşımlarının ise olumlu bir etkisi gözlenmemiştir.

PLN, SERCA2a aktivitesi üzerinde baskılayıcı role sahip olduğu için bu proteinin ifadenmesi ve/veya aktivitesi de kalp fonksiyonunu etkilemektedir. PLN ifadenmesinin diabetik sıçan kalbinde arttığı gösterilmiştir (Netticadan ve ark., 2001; Watanuki ve ark., 2004). Ne var ki, çalışmamızda PLN protein ifadenmesi deney grupları arasında farklı bulunmamıştır. Bizim çalışmamıza benzer sonuçlar farklı araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir. Altı haftalık diabetik sıçanlarda kardiyak PLN ifadenmesinin değişmediğini gösterilmiştir (Connelly ve ark., 2007). Çalışma grubumuz tarafından yapılan çalışmada da sekiz haftalık diabetik sıçanlarda PLN düzeyleri açısından gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir (Arioglu-Inan ve ark., 2013). Benzer şekilde, sıçanlarda 12 haftalık diabet süresi sonunda kardiyak PLN mRNA ifadenmesi kontrolden farklı bulunmamıştır (Teshima ve ark., 2000). Bahsi geçen çalışmalar tip 1 diabet

modelinde yapılmış olmakla birlikte, benzer sonuç genetik tip 2 diabetik farelerde de gösterilmiştir (Hammoudi ve ark., 2017). Öte yandan, tek başına PLN düzeyindense, p-PLN düzeyinin PLN düzeyine oranlanması PLN aktivitesi hakkında fikir vermektedir. Bu oranın normal koşullarda gevşeme sırasında artması beklenen p-PLN ve buna bağlı olarak azalması beklenen PLN düzeyine bağlı olarak yüksek çıkması beklenmektedir. Bu oranın düşük olması gevşemenin sağlıklı bir şekilde gerçekleşmediğini göstermektedir. Gerçekten de, diyastolik disfonksiyonun olduğu patolojilerde p-PLN/PLN oranının azaldığına dikkat çekilmektedir. Çalışmamızda, daha önce *in vivo* verilerle diabetik kalpte gözlenen diyastolik fonksiyon bozukluğunu diabete bağlı olarak azalan p-PLN/PLN oranı ile ilişkilendirmek mümkündür. Bu oran, sakubitril/valsartan ve valsartan tedavili gruplarda da diabetik gruba benzer şekilde düşük bulunmuştur.

Çalışmamızda azalan SERCA2a protein düzeylerinin ya da p-PLN/PLN oranının sakubitril/valsartan tedavisi uygulanan diabetik grupta artmamasını, bu grupta düzelmeyen diyastolik fonksiyon parametreleri (gevşeme hızı ve Tau değerleri) ile ilişkilendirmek mümkündür. Valsartan tedavili grupta ise azalan SERCA2a ifadesi ile p-PLN/PLN oranı düzelmemiştir ve bu durum kalbin gevşeme hızında iyileşme görülmemesiyle paraleldir. Ne var ki, sakubitril/valsartan tedavisinin aksine, valsartan tedavisi Tau değerlerini belli oranda iyileştirmiştir. Bu durum, Tau gevşeme sabiti gibi kalbin diyastolik fonksiyonun hakkında fikir veren parametreleri etkileyen tek bileşenin SERCA2a olmaması ile açıklanabilir.

Sonuç olarak, kardiyak gevşeme yanıtında rol oynayan SERCA2a ve p-PLN/PLN protein ifadenme düzeylerinin diabetik kalpte azalmış olması ve her iki tedavi yaklaşımıyla da düzelmemesi, ilaçların oluşturulan tip 2 diabet modelinde diyastolik disfonksiyon üzerinde iyileştirici etkilerinin olmadığını düşündürmektedir. Çalışmamızda β_1 -, β_2 - ve β_3 -AR'lerin ifadenmesinin diabete bağlı olarak nasıl değiştiği ya da tedavinin bu düzeyleri ne şekilde etkilediği belirlenemediği için bu bileşenlerin fonksiyonel deneylerden elde ettiğimiz yanıtlara katkısı moleküler düzeyde yorumlanamamıştır. Bu sonuçlardan hareketle, daha iyi valide edilmiş antikörlerle çalışılarak ve daha geniş kapsamlı moleküler çalışmalar yapılarak (ör: mRNA miktar tayini) sakubitril/valsartan kombinasyonunun kalpte kasılma ve gevşeme yanıtlarına aracılık eden yolaklar ve bileşenler üzerine etkisinin daha iyi anlaşılacağı düşünülmektedir.

VI. Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkılar

Bu proje ile önceki çalışmamızda fonksiyonel deneylerden elde edilen sonuçları moleküler verilerle ilişkilendirmek belli oranda mümkün olmuştur. Nitekim, proje sayesinde ifadenme düzeyini ölçebildiğimiz SERCA2a ve PLN genleri kalbin özellikle diyastolik fonksiyonunda, ayrıca β -AR yanıtverirliğinde önemli rol oynamaktadır. Gerçekten de, çalışmamızda diabetik grupta diyastolik disfonksiyon gözlenmiştir ve bu da azalan SERCA2a ifadenmesi ve p-PLN/PLN oranı ile örtüşmektedir. Yine aynı şekilde, bu parametrelerin tedavili gruplarda düzelmemesi, tedaviye bağlı olarak diyastolik fonksiyonun iyileştirilememesi ile son derece tutarlıdır. Bu noktalardan hareketle, tamamladığımız bu proje *in vivo* çalışmamızın eksik taraflarına bir ölçüde ışık tutmuştur. Öte yandan, çalışılan antikorlarla β -AR alttıplerinin ya da eşlik eden yolaktaki eNOS gibi bileşenlerin ifadenmesine ilişkin herhangi bir veri elde edilememesi projenin eksik yönüdür. İleride farklı antikorlarla yapılacak protein çalışmaları ve/veya mRNA ifadesi belirlemeye yönelik çalışmalarla bu eksik kısımların da tamamlanması ve *in vivo* verilerin tam olarak irdelenmesi mümkün olacaktır.

VII. Sağlanan Altyapı Olanakları ile Varsa Gerçekleştirilen Projeler

Yoktur.

VIII. Sağlanan Altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve Eğitim Alanlarındaki Katkıları

Yoktur.

IX. Kaynaklar

- ARBIN V, CLAPERON N, FOURNIÉ-ZALUSKI M-C, ROQUES BP , PEYROUX J (2003). Effects of dual angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase 24-11 chronic inhibition by mixanpril on insulin sensitivity in lean and obese Zucker rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*, **41**: 254-264.
- ARIOGLU-İNAN E, OZAKCA I, KAYKI-MUTLU G, SEPICI-DINCEL A , ALTAN VM (2013). The role of insulin–thyroid hormone interaction on β -adrenoceptor-mediated cardiac responses. *European journal of pharmacology*, **718**: 533-543.
- BADER M (2010). Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **50**: 439-465.
- BERS DM (2002). Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, **415**: 198-205.
- BIDASEE KR, ZHENG H, SHAO C-H, PARBHU SK, ROZANSKI GJ , PATEL KP (2008). Exercise training initiated after the onset of diabetes preserves myocardial function: effects on expression of β -adrenoceptors. *Journal of applied physiology*, **105**: 907-914.
- BOUDINA S , ABEL ED (2007). Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*, **115**: 3213-3223.
- BRODDE OE , MICHEL MC (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev*, **51**: 651-90.

- CONNELLY K, KELLY DJ, ZHANG Y, PRIOR DL, MARTIN J, COX A, THAI K, FENELEY MP, TSOPORIS J, WHITE K (2007). Functional, structural and molecular aspects of diastolic heart failure in the diabetic (mRen-2) 27 rat. *Cardiovascular research*, **76**: 280-291.
- DANIELS A, VAN BILSEN M, JANSSEN B, BROUNS A, CLEUTJENS J, ROEMEN T, SCHAART G, VAN DER VELDEN J, VAN DER VUSSE G, VAN NIEUWENHOVEN F (2010). Impaired cardiac functional reserve in type 2 diabetic db/db mice is associated with metabolic, but not structural, remodelling. *Acta physiologica*, **200**: 11-22.
- DHALLA NS, LIU X, PANAGIA V, TAKEDA N (1998). Subcellular remodeling and heart dysfunction in chronic diabetes. *Cardiovascular research*, **40**: 239-247.
- DİNÇER ÜD, BIDASEE KR, GÜNER Ş, TAY A, ÖZÇELİKAY AT, ALTAN VM (2001). The effect of diabetes on expression of β 1-, β 2-, and β 3-adrenoreceptors in rat hearts. *Diabetes*, **50**: 455-461.
- EINARSON TR, ACS A, LUDWIG C, PANTON UH (2018). Economic Burden of Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes: A Systematic Review. *Value Health*, **21**: 881-890.
- FDA 2015. CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH In: ADMINISTRATION, A. F. A. D. (ed.).
- FU Q, HU Y, WANG Q, LIU Y, LI N, XU B, KIM S, CHIAMVIMONVAT N, XIANG YK (2017). High-fat diet induces protein kinase A and G-protein receptor kinase phosphorylation of β 2-adrenergic receptor and impairs cardiac adrenergic reserve in animal hearts. *The Journal of physiology*, **595**: 1973-1986.
- GAUTHIER C, TAVERNIER G, CHARPENTIER F, LANGIN D, LE MAREC H (1996). Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest*, **98**: 556-62.
- GE Q, ZHAO L, REN X-M, YE P, HU Z-Y (2019). LCZ696, an angiotensin receptor-neprilysin inhibitor, ameliorates diabetic cardiomyopathy by inhibiting inflammation, oxidative stress and apoptosis. *Experimental Biology and Medicine*, **244**: 1028-1039.
- GEORGE MS, PITT GS (2006). The real estate of cardiac signaling: location, location, location. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**: 7535-6.
- GU J, NOE A, CHANDRA P, AL-FAYOUMI S, LIGUEROS-SAYLAN M, SARANGAPANI R, MAAHS S, KSANDER G, RIGEL DF, JENG AY (2010). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of LCZ696, a novel dual-acting angiotensin receptor—neprilysin inhibitor (ARNi). *The Journal of Clinical Pharmacology*, **50**: 401-414.
- HALEY JM, THACKERAY JT, KOLAJOVA M, THORN SL, DASILVA JN (2015a). Insulin therapy normalizes reduced myocardial β -adrenoceptors at both the onset and after sustained hyperglycemia in diabetic rats. *Life sciences*, **132**: 101-107.
- HALEY JM, THACKERAY JT, THORN SL, DASILVA JN (2015b). Cardiac β -adrenoceptor expression is reduced in Zucker diabetic fatty rats as type-2 diabetes progresses. *PLoS one*, **10**.
- HAMMOUDI N, JEONG D, SINGH R, FARHAT A, KOMAJDA M, MAYOUX E, HAJJAR R, LEBECHE D (2017). Empagliflozin improves left ventricular diastolic dysfunction in a genetic model of type 2 diabetes. *Cardiovascular drugs and therapy*, **31**: 233-246.
- IDF 2019. IDF Diabetes Atlas 9th Edition. In: INTERNATIONAL_DIABETES_FEDERATION (ed.) 9th ed.
- JIA G, HILL MA, SOWERS JR (2018). Diabetic cardiomyopathy: an update of mechanisms contributing to this clinical entity. *Circulation research*, **122**: 624-638.
- JIANG C, CARILLION A, NA N, DE JONG A, FELDMAN S, LACORTE J-M, BONNEFONT-ROUSSELOT D, RIOU B, AMOUR J (2015). Modification of the β -adrenoceptor stimulation pathway in Zucker obese and obese diabetic rat myocardium. *Critical care medicine*, **43**: e241-e249.
- JORDAN J, STINKENS R, JAX T, ENGELI S, BLAAK E, MAY M, HAVEKES B, SCHINDLER C, ALBRECHT D, PAL P (2017). Improved insulin sensitivity with angiotensin receptor neprilysin inhibition in individuals with obesity and hypertension. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **101**: 254-263.

- JULIUS S, KJELDSSEN SE, WEBER M, BRUNNER HR, EKMAN S, HANSSON L, HUA T, LARAGH J, MCINNES GT, MITCHELL L, PLAT F, SCHORK A, SMITH B, ZANCHETTI A, GROUP VT (2004). Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet*, **363**: 2022-31.
- KANG G, BANERJEE D (2017). Neprilysin inhibitors in cardiovascular disease. *Current cardiology reports*, **19**: 16.
- KAUMANN AJ, MOLENAAR P (1997). Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **355**: 667-81.
- KAYKI-MUTLU G, KARAOMERLIOGLU I, ARIOGLU-INAN E, ALTAN VM (2019). Beta-3 adrenoceptors: A potential therapeutic target for heart disease. *European journal of pharmacology*, 172468.
- KENNY HC, ABEL ED (2019). Heart failure in type 2 diabetes mellitus: impact of glucose-lowering agents, heart failure therapies, and novel therapeutic strategies. *Circulation research*, **124**: 121-141.
- KOSTIS JB, PACKER M, BLACK HR, SCHMIEDER R, HENRY D, LEVY E (2004). Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the Omapatrilat Cardiovascular Treatment vs. Enalapril (OCTAVE) trial. *American journal of hypertension*, **17**: 103-111.
- KUSAKA H, SUETA D, KOIBUCHI N, HASEGAWA Y, NAKAGAWA T, LIN B, OGAWA H, KIM-MITSUYAMA S (2015). LCZ696, angiotensin II receptor-neprilysin inhibitor, ameliorates high-salt-induced hypertension and cardiovascular injury more than valsartan alone. *American journal of hypertension*, **28**: 1409-1417.
- LAMBERTS RR, LINGAM SJ, WANG H-Y, BOLLEN IA, HUGHES G, GALVIN IF, BUNTON RW, BAHN A, KATARE R, BALDI JC (2014). Impaired relaxation despite upregulated calcium-handling protein atrial myocardium from type 2 diabetic patients with preserved ejection fraction. *Cardiovascular diabetology*, **13**: 72.
- LIM HS, MACFADYEN RJ, LIP GY (2004). Diabetes mellitus, the renin-angiotensin-aldosterone system, and the heart. *Archives of internal medicine*, **164**: 1737-1748.
- LIU X, SUZUKI H, SETHI R, TAPPIA PS, TAKEDA N, DHALLA NS (2006). Blockade of the renin-angiotensin system attenuates sarcolemma and sarcoplasmic reticulum remodeling in chronic diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1084**: 141-154.
- LIU X, XU Q, WANG X, ZHAO Z, ZHANG L, ZHONG L, LI L, KANG W, ZHANG Y, GE Z (2015). Irbesartan ameliorates diabetic cardiomyopathy by regulating protein kinase D and ER stress activation in a type 2 diabetes rat model. *Pharmacological research*, **93**: 43-51.
- MALEK V, GAIKWAD AB (2017). Neprilysin inhibitors: a new hope to halt the diabetic cardiovascular and renal complications? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **90**: 752-759.
- MCDOWELL G, NICHOLLS DP (2000). The therapeutic potential of candoxatril, a neutral endopeptidase inhibitor, in humans. *Cardiovascular drug reviews*, **18**: 259-270.
- MCMURRAY JJ, PACKER M, DESAI AS, GONG J, LEFKOWITZ MP, RIZKALA AR, ROULEAU JL, SHI VC, SOLOMON SD, SWEDBERG K (2014). Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med*, **371**: 993-1004.
- MIYOSHI T, NAKAMURA K, MIURA D, YOSHIDA M, SAITO Y, AKAGI S, OHNO Y, KONDO M, ITO H (2019). Effect of LCZ696, a dual angiotensin receptor neprilysin inhibitor, on isoproterenol-induced cardiac hypertrophy, fibrosis, and hemodynamic change in rats. *Cardiology journal*, **26**: 575-583.
- NETTICADAN T, TEMSAH RM, KENT A, ELIMBAN V, DHALLA NS (2001). Depressed levels of Ca²⁺-cycling proteins may underlie sarcoplasmic reticulum dysfunction in the diabetic heart. *Diabetes*, **50**: 2133-2138.
- PACKER M, CALIFF RM, KONSTAM MA, KRUM H, MCMURRAY JJ, ROULEAU J-L, SWEDBERG K (2002). Comparison of omapatrilat and enalapril in patients with chronic heart failure: the Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events

- (OVERTURE). *Circulation*, **106**: 920-926.
- PALOMER X, PIZARRO-DELGADO J , VÁZQUEZ-CARRERA M (2018). Emerging actors in diabetic cardiomyopathy: heartbreaker biomarkers or therapeutic targets? *Trends in pharmacological sciences*, **39**: 452-467.
- ROKSNOER LC, VAN VEGHEL R, VAN GRONINGEN MCC-, DE VRIES R, GARRELDs IM, BHAGGOE UM, VAN GOOL JM, FRIESEMA EC, LEIJTEN FP , HOORN EJ (2016). Blood pressure-independent renoprotection in diabetic rats treated with AT1 receptor–neprilysin inhibition compared with AT1 receptor blockade alone. *Clinical Science*, **130**: 1209-1220.
- ROZEC B , GAUTHIER C (2006). β 3-Adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacology & therapeutics*, **111**: 652-673.
- SAVARESE JJ , BERKOWITZ BA (1979). β -Adrenergic receptor decrease in diabetic rat hearts. *Life sciences*, **25**: 2075-2078.
- SEFEROVIC JP, CLAGGETT B, SEIDELMANN SB, SEELY EW, PACKER M, ZILE MR, ROULEAU JL, SWEDBERG K, LEFKOWITZ M , SHI VC (2017). Effect of sacubitril/valsartan versus enalapril on glycaemic control in patients with heart failure and diabetes: a post-hoc analysis from the PARADIGM-HF trial. *The lancet Diabetes & endocrinology*, **5**: 333-340.
- SILVERTHORN DU (2016). *Human Physiology an Integrated Approach*, In: CHURCHMAN, K. (ed.).740-742.
- SINGH JS, BURRELL LM, CHERIF M, SQUIRE IB, CLARK AL , LANG CC (2017). Sacubitril/valsartan: beyond natriuretic peptides. *Heart*, **103**: 1569-1577.
- SIVASANKAR D, GEORGE M , SRIRAM DK (2018). Novel approaches in the treatment of diabetic cardiomyopathy. *Biomed Pharmacother*, **106**: 1039-1045.
- SOLOMON SD, ZILE M, PIESKE B, VOORS A, SHAH A, KRAIGHER-KRAINER E, SHI V, BRANSFORD T, TAKEUCHI M , GONG J (2012). The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in heart failure with preserved ejection fraction: a phase 2 double-blind randomised controlled trial. *The Lancet*, **380**: 1387-1395.
- SUEMATSU Y, MIURA SI, GOTO M, MATSUO Y, ARIMURA T, KUWANO T, IMAIZUMI S, IWATA A, YAHIRO E , SAKU K (2016). LCZ696, an angiotensin receptor–neprilysin inhibitor, improves cardiac function with the attenuation of fibrosis in heart failure with reduced ejection fraction in streptozotocin-induced diabetic mice. *European journal of heart failure*, **18**: 386-393.
- TAKADA A, MIKI T, KUNO A, KOUZU H, SUNAGA D, ITOH T, TANNO M, YANO T, SATO T , ISHIKAWA S (2012). Role of ER stress in ventricular contractile dysfunction in type 2 diabetes. *PloS one*, **7**: e39893.
- TAMARGO M , TAMARGO J (2017). Future drug discovery in renin-angiotensin-aldosterone system intervention. *Expert opinion on drug discovery*, **12**: 827-848.
- TESHIMA Y, TAKAHASHI N, SAIKAWA T, HARA M, YASUNAGA S, HIDAKA S , SAKATA T (2000). Diminished expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine sensitive Ca²⁺ channel mRNA in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **32**: 655-664.
- TURNER AJ, BROWN CD, CARSON JA , BARNES K 2002. The neprilysin family in health and disease. *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2*. Springer.
- TURNER AJ, ISAAC RE , COATES D (2001). The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays*, **23**: 261-269.
- VARDENY O, TACHENY T , SOLOMON S (2013). First-in-class angiotensin receptor neprilysin inhibitor in heart failure. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **94**: 445-448.
- VARMA U, KOUTSIFELI P, BENSON V, MELLOR K , DELBRIDGE L (2018). Molecular mechanisms of cardiac pathology in diabetes–Experimental insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, **1864**: 1949-1959.
- WANG Q, LIU Y, FU Q, XU B, ZHANG Y, KIM S, TAN R, BARBAGALLO F, WEST T ,

- ANDERSON E (2017). Inhibiting insulin-mediated β 2-adrenergic receptor activation prevents diabetes-associated cardiac dysfunction. *Circulation*, **135**: 73-88.
- WATANUKI S, MATSUDA N, SAKURAYA F, JESMIN S , HATTORI Y (2004). Protein kinase C modulation of the regulation of sarcoplasmic reticular function by protein kinase A-mediated phospholamban phosphorylation in diabetic rats. *British journal of pharmacology*, **141**: 347-359.
- WOO AY , XIAO RP (2012). beta-Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside. *Acta Pharmacol Sin*, **33**: 335-41.
- WU H, CHANG C, CHENG K, YE H C , CHENG J (2010). Increase of plasma insulin by racecadotril, an inhibitor of enkephalinase, in wistar rats. *Hormone and metabolic research*, **42**: 261-267.
- WU T, DONG Z, GENG J, SUN Y, LIU G, KANG W, ZHANG Y , GE Z (2011). Valsartan protects against ER stress-induced myocardial apoptosis via CHOP/Puma signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **42**: 496-502.
- YARAS N, BILGINOGLU A, VASSORT G , TURAN B (2007). Restoration of diabetes-induced abnormal local Ca^{2+} release in cardiomyocytes by angiotensin II receptor blockade. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **292**: H912-H920.
- YUSUF S, OSTERGREN JB, GERSTEIN HC, PFEFFER MA, SWEDBERG K, GRANGER CB, OLOFSSON B, PROBSTFIELD J , MCMURRAY JV (2005). Effects of candesartan on the development of a new diagnosis of diabetes mellitus in patients with heart failure. *Circulation*, **112**: 48-53.
- ZHANG L, CANNELL MB, PHILLIPS AR, COOPER GJ , WARD M-L (2008). Altered calcium homeostasis does not explain the contractile deficit of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*, **57**: 2158-2166.
- ZHU W-Z, ZHENG M, KOCH WJ, LEFKOWITZ RJ, KOBILKA BK , XIAO R-P (2001). Dual modulation of cell survival and cell death by β 2-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**: 1607-1612.

X. Ekler

a. Mali Bilanço ve Açıklamaları

03.2 TÜKETİME YÖNELİK MAL VE MALZEME ALIMLARI (SARF MALZEME)	
PHOSPHO-ENOS PSER1177 EA, EA, US Antibody, eNOS Antibody	4.914,00
RIPA BUFFER, 50 ml	529,82
GAPDH (14C10) Rabbit mAb, 100 μ l	2.143,80
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250	1.568,16
Anti-beta 1 Adrenergic Receptor antibody, 100 μ l , Anti-beta 2 Adrenergic Receptor antibody, 100 μ g	6.339,60
TOPLAM	15.495,38

b. Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar

Yoktur.

c. Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar

Yoktur.

d. Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) (Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz)

Yoktur.

- e. Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler (**Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz**)

Yoktur.

NOT: Verilen sonuç raporu bir (1) nüsha olarak ciltsiz şekilde verilecek, sonuç raporu Komisyon onayından sonra ciltlenerek bir kopyasının yer aldığı CD ile birlikte sunulacaktır. Sonuç raporunda proje sonuçlarını içeren, ISI' nın SCI veya SSCI veya AHCI dizinleri kapsamında ve diğer uluslar arası dizinlerce taranan hakemli dergilerde yayınlanmış makaleler, III. Materyal ve Yöntem ve IV. Analiz ve Bulgular bölümleri yerine kabul edilir.

