



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DENEYSEL TİP I DİYABETTE ARALIKLI HİPOKSİNİN SOL VENTRİKÜL FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Fırat AKAT

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan FIÇICILAR**

**ANKARA
2016**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL TİP I DİYABETTE ARALIKLI HİPOKSİNİN SOL
VENTRİKÜL FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Fırat AKAT

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hakan FIÇICILAR

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
15L0230004 ve 13B3330002 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
2016

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Deneyisel Tip I Diyabette Aralıklı Hipoksinin Sol Ventrikül Fonksiyonları Üzerine Etkisinin İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneyisel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Fırat AKAT

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Fizyoloji Anabilim Dalında
Fırat AKAT tarafından hazırlanan
“Deneysel Tip I Diyabette Aralıklı Hipoksinin Sol Ventrikül Fonksiyonları Üzerine
Etkisinin İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ
olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22.12.2016


Prof.Dr. Belma TURAN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof.Dr. Hakan FIÇICILAR
Ankara Üniversitesi
Raportör


Prof.Dr. Metin BAŞTUĞ
Ankara Üniversitesi
Üye


Prof.Dr. Deniz ERBAŞ
Gazi Üniversitesi
Üye


Prof.Dr. Gülriz ERİŞGEN
TOBB ETÜ Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. K. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiii

1.GİRİŞ

1.1. Diyabetik Kardiyomiyopati	1
1.1.1. Yapısal Değişimler	2
1.1.2. Fonksiyonel Değişimler	2
1.1.3. Patolojik Değişimler	3
1.1.4. Patofizyoloji	3
1.1.5. Streptozotosin ile İndüklenen Diyabetik Kardiyomiyopati Modeli	11
1.2.Yüksek İrtifa ve Hipoksi	11
1.2.1. Aralıklı Hipoksi	13
1.2.2. Hipoksik Önkoşullama	15
1.2.3. Hipoksik Önkoşullama ve HIF	16
1.3.HIF – VEGF – Anjiyogenez Aksı	17
1.3.1. Hipoksi ile İndüklenen Faktör (HIF)	18
1.3.2. VEGF ve Anjiyogenezis	20
1.3.3. Prolil Hidroksilazlar	22
1.4.Matriks Metalloproteinazları	25
1.5.Amaç ve Hipotez	28

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1.Deney Hayvanları	34
2.1.1. Fonksiyonel Çalışmalarda Kullanılan Hayvanlar	34
2.1.2. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Hayvanlar	35
2.2.DeneySEL Tip I Diyabet Oluşturulması	35
2.3.Hipoksi Protokolü	35
2.4.Hayvanların Sakrifikasyonu	36
2.5.Langendorff Yöntemi ile Kalp Fonksiyonlarının Ölçülmesi	36
2.6.Western Blot Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini	37
2.7.Total Oksidan Status (TOS) ve Total Antioksidan Status (TAS) Ölçümleri	38
2.7.1. TAS Ölçümü	39
2.7.2. TOS Ölçümü	40
2.7.3. Oksidatif Stres İndeksinin (OSİ) Hesaplanması	40
2.8.Kapiller Yoğunluğun İncelenmesi	40
2.9.İstatistiksel Analiz	41

3. BULGULAR

3.1.Fonkiyon Çalışması İçin Kullanılan Hayvanların Takip Değerleri	43
--	----

3.2.Sol Ventrikül Fonksiyonu Ölçümleri	46
3.2.1. Bazal Fonksiyon Ölçümleri	46
3.2.2. İnotropik Rezerv Ölçümleri	49
3.3.Molekül Çalışması İçin Alınan Hayvanların Takip Değerleri	51
3.4.Western Blot Yöntemi ile Protein Düzeylerinin İncelenmesi	54
3.4.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)	54
3.4.2. Prolil Hidroksilazlar (PHD2 ve PHD3)	55
3.4.3. Matriks Metalloproteinazları (MMP-2 ve MMP-9)	57
3.5.Miyokardiyal Kapiller Yoğunluk	59
3.6.Redoks Statusu	61
3.6.1. Serum Oksidan ve Antioksidan Status Ölçümleri	61
3.6.2. Miyokardiyal Oksidan ve Antioksidan Status Ölçümleri	63
4.TARTIŞMA	
4.1.Hayvan Takip Değerleri (Vücut Ağırlığı, Kalp Ağırlığı ve Glukoz Düzeyleri)	65
4.2.Sol Ventrikül Fonksiyon Ölçümleri	67
4.3. Sol Ventrikül VEGF ve Kapiller Yoğunluk Düzeyleri	70
4.4.Sol Ventrikül PHD Düzeyleri	78
4.5.Sol Ventrikül MMP Düzeyleri	81
4.6.Serum ve Miyokardiyal Redoks Statusu	87
5.SONUÇ ve ÖNERİLER	93
ÖZET	95
SUMMARY	96
KAYNAKLAR	97
EKLER	
Ek-1. Etik Kurul Raporu	119
ÖZGEÇMİŞ	121

ÖNSÖZ

Türkiye'nin ilk bilim tarihi yazarlarından Galip ATA dehayı “meşakkate tahammül gücü” olarak tanımlar. Gerçekten de birazdan okuyacağınız bu tez çalışması son halini alana kadar daha önceden tahmin edilen/edilmeyen pek çok güçlükle karşılaşıldı, kimisi aşıldı, kimisi çalışmamızın eksikliği olarak hala aşılmayı bekliyor. Yine de bu güçlüklerin tezimi ve kendimi en çok geliştiren itkiler olduğunu düşünüyorum, doktora eğitiminin bana güçlükleri sevmeyi öğrettiğini anlıyorum. Teorik ve metodolojik kazanımlarımın yanı sıra iç dünyama yönelik katkılarından dolayı doktora eğitim süreci ile akademik kariyerimin “izometrik kasılma” evresini tamamladığımı, topladığım enerji ile artık daha üretken olacağım kısma geçmekte olduğumu umut ediyorum.

Bu zorlu yolculukta, bana önderlik ve yol arkadaşlığı eden bazı özel insanları burada anmak istiyorum;

Öncelikle ve özellikle; tez danışmanlığından çok ötede bir iletişim kurduğum, hayatın her alanında örnek duruşu ile bana yol gösteren; düştüğüm anlarda beni tekrar ayağa kaldıran, rasyonel ve realist planları ile devasa görünen problemleri kolayca aşmamı sağlayan sayın Prof. Dr. Hakan FIÇICILAR'a;

Gerek teorik gerekse metodolojik açıdan gelişmeme verdiği katkılar, yerinde ve zamanında yaptığı kimi zaman sert ama her zaman haklı olan uyarıları ile beni ve tezimi fersah fersah ileriye götüren sayın Prof. Dr. Belma TURAN'a;

Fizyoloji Bölümü'ndeki ilk günümünden bu yana her zaman varlığını arkamda hissettiğim, hayatımda gördüğüm en toleranslı insanlardan birisi olan sayın Prof. Dr. Metin BAŞTUĞ'a;

Metodolojik anlamda çalışmanın tamamlanmasına büyük katkılarda bulunan Biyofizik Anabilim Dalı asistanlarından sevgili Erkan, Ayşegül ve Yusuf'a;
Tez çalışmam sırasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili Hasan ve Sertaç'a;

Deneylere gömüldüğüm günlerde sürekli ihmal ettiğim, bu uzun maratону tamamlamamda büyük emeği olan sevgili eşim Özlem'e;

Teşekkürü bir borç biliyorum.

Son olarak, bana yaşama gayesi aşıl原因, ailemizin 2,5 yıllık üyeleri sevgili kızım Irmak Ceren ve sevgili oğlum Ali Devrim'e bu tez çalışmasını armağan ediyorum.

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACE	Anjiyotensin Converting Enzyme
AGEs	İleri Glikozilasyon Ürünleri
AH	Aralıklı Hipoksi
Ang-2	Anjiyogenin-2
ARNT	Aril Hidrokarbon Reseptörünün Nükleer Translokatorü
CAT	Katalaz
DAG	Diaçilgliserol
DKMP	Diyabetik Kardiyomiyopati
DM	Diyabet Grubu
DM+AH	Diyabet + Hipoksi Grubu
DMOG	Dimetilglioksal
EC ₅₀	Maksimal Yanıtı Oluşturan Konsantrasyonun %50 si
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
EHD	Endotelyal Hücre Disfonksiyonu
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FIH	HIF-1 'i İnhibe Eden Faktör
GADPH	Gliseraldehit Fosfat Dehidrogenaz
GPc	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Redükte Glutasyon
GSSG	Glutasyon Disülfid
HIF	Hipoksi ile İndüklenen Faktör
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HO-1	Heme Oksijenaz-1
HRE	Hipoksi Respons Elementleri
HUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
I/R	İskemi / Reperfüzyon
IPC	İskemik Önkoşullama
ISO	Isoproterenol
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
K	Kontrol Grubu

KA/VA	Kalp Ağırlığı/Vücut Ağırlığı Oranı
KAH	Koroner Arter Hastalıkları
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LVDP	Sol Ventrikül Gelişimsel Basıncı
MHC	Miyozin Ağır Zinciri
Mİ	Miyokart infarktüsü
MMP	Matriks Metalloproteinazları
NCX	Na ⁺ -Ca ⁺² Antiport Mekanizması
NEFA	Esterleşmemiş Yağ Asitleri
NF-κβ	Nükleer Faktör - κβ
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NOX	NADPH Oksidaz
•O ₂ ⁻	Süperoksit Radikali
ODD	Oksijen Bağımlı Degradasyon
•OH ⁻	Hidroksil Radikali
ONOO ⁻	Peroksinitrit
OSAS	Obstrüktif Uyku Apnesi Sendromu
OSI	Oksidatif Stres İndeksi
PAI-1	Plazminojen Aktivitör İnhibitör-1
PARP	Poli (ADP Riboz) Polimeraz Enzimi
PHD	Prolil-4 Hidroksilaz Domain
PKC	Protein Kinaz C
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
PPARs	Peroksizom-Proliferatörle Aktive Olan Reseptörler
pVHL	von Hippel Lindau tümör baskılayıcı geninin ürünü
RAGEs	İleri Glikozilasyon Ürünlerinin Reseptörleri
ROS	Reaktif Oksijen Türevleri
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sültat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SERCA 2a	Sarkoplazmik/Endoplazmik Retikulum Ca ⁺² ATPazı 2a
SIAH	Seven In Absentia Homolog
SOD	Süperoksit Dismutaz

STZ	Streptozotosin
SWOP	İkinci Koruma Penceresi
TAS	Total Antioksidan Status
TOS	Total Oksidan Status
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TSP-1	Trombospandin-1
VEGF	Vasküler Endotelyal Faktör
VEGFR	Vasküler Endotelyal Faktör Reseptörü
vWF	von-Willebrand faktör
XO	Ksantin Oksidaz



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Aralıklı hipoksi uygulamasının şiddet ve sıklığının olumlu ve olumsuz etkileri (Opazo-Navarrete ve Mitchell, (2014)'den değiştirilerek alınmıştır).	14
Şekil 1.2. Hipoksi şiddetinin olumlu ve olumsuz etkileri (Verges ve ark., 2015'den değiştirilerek alınmıştır).	15
Şekil 1.3. HIF-1'in bazı alt hedefleri (Hong ve ark., 2004'den değiştirilerek alınmıştır).	20
Şekil 3.1. Fonksiyon çalışması için kullanılan hayvanların, deney protokolü süresince vücut ağırlıklarında meydana gelen değişim (%)	44
Şekil 3.2. Hayvanların terminal kan glukoz düzeyleri	46
Şekil 3.3. Sol ventrikül gelişimsel basıncı ortalama değerleri (LVDP). (ort±SH)	47
Şekil 3.4. Basınç gelişim hızı (+dP/dt) ve basınç bozunum hızı (-dP/dt) ortalama değerleri.	48
Şekil 3.5. Deney gruplarına ait izoproterenol doz-cevap eğrileri.	50
Şekil 3.6. Molekül çalışması için kullanılan hayvanların, deney protokolü süresince vücut ağırlıklarında meydana gelen değişim (%)	52
Şekil 3.7. Hayvanların terminal kan glukoz düzeyleri	53
Şekil 3.8. Sol ventrikül VEGF protein ekspresyon düzeyleri	55
Şekil 3.9. Sol ventrikül (A) PHD2 ve (B) PHD3 protein ekspresyon düzeyleri	57
Şekil 3.10. Sol ventrikül (A) MMP-2 ve (B) MMP-9 protein ekspresyon düzeyleri	59
Şekil 3.11. Anti-caveolin 1 immünohistokimya boyaması. Ok: damar endotel hücreleri (Bar: 50 µm).	60
Şekil 3.12. Sol ventrikül kapiller yoğunlukları (40X büyütmede)	60

Şekil 3.13. Serum **(A)** Total oksidan status **(B)** Total antioksidan status **(C)** 62
Oksidatif status indeks değerleri

Şekil 3.14. Miyokardiyal **(A)** Total oksidan status **(B)** Total antioksidan status 64
(C) Oksidatif status indeks değerleri

Şekil 5.1. Kronik aralıklı hipoksi uygulamasının diyabetik kalpte fonksiyon 93
bozulmasını önleme mekanizmasında VEGF-damarlanma yolağı ve MMP'lerin
rolü (kırmızı vurgular çalışmanın kısıtlarına işaret etmektedir).



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1: Matriks metalloproteinazları ailesi. John ve Tuszynski (2001)'den değiştirilerek alınmıştır.	26
Çizelge 1.2: TIMP alt tipleri.	28
Çizelge 3.1: Fonksiyon çalışmasında kullanılan hayvanların başlangıç (Baş.) ve terminal vücut ağırlıkları (Son) (g)	43
Çizelge 3.2: Fonksiyon çalışmasında kullanılan hayvanların vücut ağırlığı değişimi (%)	44
Çizelge 3.3: Hayvanların ıslak kalp ağırlıkları (KA) (g), terminal vücut ağırlıkları (VA) (g) ve KA/VA oranları ($\times 10^3$)	45
Çizelge 3.4: Hayvanların terminal kan glukoz düzeyleri (mg/dl)	45
Çizelge 3.5: Sol ventrikül gelişimsel basıncı (LVDP) değerleri (mmHg).	47
Çizelge 3.6: Basınç gelişim hızı (+dP/dt) ve basınç bozunum hızı (-dP/dt) değerleri (mmHg/s).	48
Çizelge 3.7: İsopterenolün artan dozlarına verilen yanıt artışı (% artış olarak verilmiştir. % artış = $[\text{İlaç uygulaması ile elde edilen LVDP değeri} / \text{İlaç uygulaması öncesi LVDP değeri}] \times 100 - 100$).	49
Çizelge 3.8: İsopterenol EC ₅₀ değerleri (logaritmik).	50
Çizelge 3.9: Molekül çalışmasında kullanılan hayvanların başlangıç (Baş.) ve terminal vücut ağırlıkları (Son) (g)	51
Çizelge 3.10: Molekül çalışmasında kullanılan hayvanların vücut ağırlığı değişimi (%)	52
Çizelge 3.11: Hayvanların terminal kan glukoz düzeyleri (mg/dl)	53
Çizelge 3.12: Sol ventrikül VEGF protein ekspresyon düzeyleri	54
Çizelge 3.13: Sol ventrikül PHD2 protein ekspresyon düzeyleri	56
Çizelge 3.14: Sol ventrikül PHD3 protein ekspresyon düzeyleri	56
Çizelge 3.15: Sol ventrikül MMP-2 protein ekspresyon düzeyleri	58
Çizelge 3.16: Sol ventrikül MMP-9 protein ekspresyon düzeyleri	58
Çizelge 3.17: Sol ventrikül kapiller yoğunlukları (birim)	59
Çizelge 3.18: Serum Total Oksidan Status Değerleri	61

Çizelge 3.19: Serum Total Antioksidan Status Değerleri	61
Çizelge 3.20: Serum Oksidatif Status İndeksi Değerleri (OSİ=TOS/TAS)	62
Çizelge 3.21: Miyokardiyal Total Oksidan Status Değerleri	63
Çizelge 3.22: Miyokardiyal Total Antioksidan Status Değerleri	63
Çizelge 3.23: Miyokardiyal Oksidatif Status İndeksi Değerleri (OSİ=TOS/TAS)	63
Çizelge 4.1: Diyabet süresi ile VEGF ve damarlanma ilişkisi	76



1. GİRİŞ

Diabetes mellitus kalıtsal ve çevresel etkenlerin bileşimi ile insülin eksikliği ve/veya insülinin periferik dokularda etkinliğinin bozulması sonucu oluşan, kan glukoz düzeyinin yüksekliği (hiperglisemi) ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Diyabet hastalığı tip I (insüline bağımlı) ve tip II (insülin bağımsız) olmak üzere iki sınıfa ayrılmıştır (Melmed ve ark, 2016). Tip I diyabet, pankreatik beta hücrelerinin harabiyet sonucu insülin üretememesi ile ortaya çıkan ve sonuçta tam insülin yetersizliğinin oluşması ile karakterize bir hastalıktır. Diyabetli hastalar arasında tip I diyabetlilerin oranı %10 olarak belirtilmektedir (Lambert ve Bingley, 2002). Tip II diyabet ise insülinin etkisine karşı direnç gelişmesi ile karakterize ve sonuçta insülin sentezi ve salgılanmasının azalması ya da tamamen ortadan kalkmasına yol açabilen bir hastalıktır. Dünyada 2015 yılı itibari ile dünyadaki diyabetli birey sayısı 415 milyon iken bu sayının 2040 yılında bu sayının 642 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun raporuna göre dünyada her 11 yetişkinden birisi diyabetlidir, diyabet ve diyabete bağlı hastalıklar dünya sağlık harcamaların %12'sini oluşturmaktadır. (IDF, 2015). Diyabet hastalığı tedavi edilmez ise birçok komplikasyona yol açabilir. Akut komplikasyonları arasında diyabetik ketoasidoz ve nonketotik hiperosmolar koma, kronik komplikasyonları arasında kardiyovasküler bozukluklar, kronik böbrek yetmezliği ve diyabetik retinopati sayılabilir (McPhee ve Hammer, 2010).

1.1. Diyabetik Kardiyomiyopati

Rubler ve ark. (1972), diyabetik renal mikroanjiyopatisi olan dört hastada yaptıkları post-mortem çalışmada sol ventrikülün bilinen sebeplerden bağımsız olarak dilate olduğunu gözlemlemişler ve sol ventrikül dilatasyonu ile diyabet arasında ilişki kurmuşlardır. "Diyabetik kardiyomiyopati" kavramı bu çalışma ile tıp literatürüne kazandırılmıştır (Rubler ve ark., 1972). Günümüzde diyabetik kardiyomiyopati klinik olarak epikardiyal koroner arter hastalığı, hipertansiyon ve kapak hastalıklarından bağımsız olarak miyokardiyal yapı ve performansta meydana gelen anomaliler olarak tanımlanmaktadır (Aneja ve ark., 2008).

Diyabetli bireylerde kardiyomiyosit hasarına neden olan üç temel metabolik bozukluk hiperglisemi, hiperlipidemi ve hiperinsülinemidir. Bu koşulların meydana getirdiği kardiyak değişimler üç başlıkta incelenebilir:

1.1.1. Yapısal Değişimler

Çok sayıda katılımcı ile yapılan ve epidemiyolojik bir çalışma özelliği taşıyan Strong Heart Study (Devereux ve ark., 2000) çalışmasında diyabetik bireyler ile sağlıklı kontroller karşılaştırılmış ve diyabetiklerde sağlıklılara kıyasla sol ventrikül kütesinin, duvar kalınlığının ve arteriyel sertliğin vücut kitle indeksi ve kan basıncı parametrelerinden bağımsız olarak artmış olduğu tespit edilmiştir. Yine Framingham Heart Study çalışmasında, sol ventrikül kütesinin ve duvar kalınlığının diyabetli bireylerdeki artışı gösterilmiş, kadınlarda bu artışın daha belirgin olduğu vurgulanmıştır. Ek olarak bu değişimlerin glukoz intoleransı ve obezitenin derecesi ile orantılı olduğu belirtilmiştir (Kannel ve ark., 1974).

1.1.2. Fonksiyonel Değişimler

Diyastolik disfonksiyon diyabetik kardiyomiyopatinin en erken fonksiyonel bulgusudur. Diyastolik disfonksiyon, kalp döngüsünün diyastol periyodunda gerçekleşen olayların yavaşlaması diyastolik sürecin uzaması olarak tanımlanabilir. Sol ventrikül gevşeme hızındaki azalma standart ekokardiyografi ve Doppler ekokardiyografi yöntemi kullanılarak gösterilebilir. Ancak diyastolik disfonksiyon sadece aktif gevşeme süreçlerinde meydana gelen bozulmadan değil aynı zamanda sol ventrikülün pasif sertliğinin artışından da kaynaklanır. Sistolik disfonksiyon diyabetik kardiyomiyopatide genellikle geç ve belirgin diyastolik disfonksiyonu olan hastalarda görülen bir bulgudur. Sistolik disfonksiyon kalbin kanı fırlatma yeteneğinde meydana gelen azalmayı tanımlar. Temel bulgusu sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunun azalışıdır (Hayat ve ark., 2004).

Diyabetiklerde kalpte sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu ilk kez Regan ve ark. (1977),’nın kardiyak kateterizasyon yöntemi kullanarak yaptıkları çalışma ile gösterilmiştir. Araştırmacılar; koroner arter hastalığı olmayan, normotansif ve herhangi başka bir kalp rahatsızlığı geçirmemiş diyabetik hastalarda sol ventrikül diyastol sonu basıncında artış, diyastol sonu hacminde azalma bulmuşlar, ejeksiyon fraksiyonunda bir değişiklik göstermemişlerdir (Regan ve ark., 1977). Diyabetik bireylerde aynı zamanda kardiyak rezerv azalması da gözlemlenir. Bu durum egzersize verilen sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu yanıtında azalma ile karakterizedir (Mildenberger ve ark., 1984).

1.1.3. Patolojik Değişimler

Diyabetik bireylerden alınan kalp biyopsileri sonucunda kalp dokusunda intersitisyel fibrozis, miyosit hipertrofisi ve artmış kontraktıl protein glikozilasyonu gösterilmiştir. Tüm bunların diyabetiklerde görülen azalmış diyastolik kompliyans ve ventriküler hipertrofi ile ilişkili olduğu kabul edilir. (Das ve ark., 1987; Nunoda ve ark., 1985; Syrový ve Hodny, 1992).

1.1.4. Patofizyoloji

Her ne kadar diyabetik kardiyomiyopatinin patofizyolojik mekanizmaları tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamış ise de, meydana gelen kardiyak değişikliklerin nedenlerine ilişkin çok sayıda yolak önerilmektedir. Bu yollar tek başlarına değil sinerjik bir şekilde çalışarak diyabetik kardiyomiyopatiye neden olurlar.

a) Artmış reaktif oksijen türevleri ve ileri glikozilasyon son ürünleri

Reaktif oksijen türevleri (ROS), aşırı derecede reaktif özellik gösteren oksijen molekülleridir. Bu moleküller serbest radikaller (süperoksit) ve serbest radikal oluşturma potansiyeline sahip molekülleri (hidrojen peroksit) kapsar. Fizyolojik koşullarda hücrede üretilen ROS’un büyük bir kısmı mitokondri kaynaklıdır. Patolojik durumlarda başka kaynaklardan da üretimi söz konusu olabilir.

Mitokondriyal ROS üretiminin arttığı çeşitli dokularda ve hiperglisemiye maruz kalan hücre kültürlerinde gösterilmiştir (Brownlee, 1995). Buna ek olarak diyabette NADPH oksidaz gibi mitokondri dışı kaynaklardan da ROS üretimi gerçekleşir. Ayrıca nitrik oksit sentaz (NOS1) aktivitesindeki düşüş ve eşlik eden ksantin oksidaz aktivitesindeki artış da ROS miktarını arttırıcı etkide bulunur (Li ve ark., 2006; Saraiva ve ark., 2006).

ROS üretimi antioksidan savunma sistemlerinin tamponlama kapasitesini aşarsa oksidatif stres'e yol açar. Oksidatif stresin; oksidasyon üzerinden gerçekleşen hücre hasarı, nitrik oksit (NO) ile etkileşimine bağlı olarak vasküler homeostazisin bozulması, yıkıcı hücre içi yolakların aktivasyonu (redoks sinyalizasyonu) gibi birçok zararlı etkisi vardır. Redoks sinyalizasyonunun pek çok farklı transkripsiyon faktörü üzerinden kontraktıl proteinlerin ekspresyonunda bozulmaya neden olduğu bilinmektedir (Gao ve ark., 1996).

Ek olarak ROS, DNA hasarına yol açar. Bu hasarın tamiri için poli (ADP riboz) polimeraz (PARP) enzimi aktive olur. Aşırı derecede aktive olan PARP enzimi gliseralehit fosfat dehidrogenazı (GADPH) inhibe ederek glukozun glikolitik yol yerine hiperglisemi kaynaklı hücresel hasarı oluşturduğu düşünülen alternatif biyokimyasal yollara (ileri glikozilasyon ürünlerinin artışı, hekzosamin ve poliol akımı artışı) yönelmesine neden olur (Du ve ark., 2003). PARP enzimi aynı zamanda nükleer faktör (NF) κ B'yı aktive ederek endotelin-1 ve reseptörlerinin transkripsiyonunu aşırı derecede arttırmak suretiyle kalpte hasara neden olur (Szabo, 2002).

Kollajen glukoz ile etkileşime girerek Schiff bazlarını oluşturur. Schiff bazları takip eden haftalarda glikozile kollajene (Amadori ürünleri) dönüşür. Amadori ürünleri çeşitli kimyasal modifikasyonlara uğrayarak ileri glikozilasyon son ürünlerine (AGEs) dönüşürler. Bu ürünler kollajen ile çapraz bağ yaparak kollajeni stabil hale getirir. Yıkıma uğrayamayan kollajen arteriyel ve miyokardiyal sertliğe, endotel disfonksiyonuna ve aterosklerotik plak oluşumuna neden olur. İleri glikozilasyon son ürünlerinin serumdaki seviyeleri ile sol ventrikül gevşeme zamanı arasında bir

ilişkinin varlığı Berg ve ark. (1999), tarafından gösterilmiştir (Berg ve ark., 1999). Ayrıca ileri glikozilasyon son ürünleri kollajenin yanı sıra dolaşımdaki proteinlerle (örneğin LDL) çapraz bağlantı oluşturabilir ve reseptör etkileşimleri üzerinden nitrik oksit sinyalizasyonunun bozulmasına neden olur (Zieman ve Kass, 2004).

AGEs reseptörlerinin (RAGEs) kardiyomiyositlerde bulunduğu bilinmektedir (Petrova ve ark., 2002). AGEs bağlayan bu reseptörler alt hedeflerini aktive ederek çeşitli yıkıcı etkilerin ortaya çıkışına aracılık ederler. Oksidatif stres hem AGEs miktarını hem de RAGEs ekspresyonunu artırarak NF- κ B aktivasyonuna yol açar, bu aktivasyon miyozin ağır zincirinin (MHC) α -MHC formundan β -MHC formuna dönüşümünü indükleyerek miyokardiyal kontraktileti bozar (Murarka ve Mohaved, 2010).

AGEs sinyalizasyonu aynı zamanda miyokardiyal kalsiyum homeostazisi ile ilgilidir. Sarkoplazmik/endoplazmik retikulum Ca^{+2} ATPaz 2a (SERCA2a) kasta kalsiyum salınımını takiben intrasellüler kalsiyum depolarını tekrar doldurarak sitozolik kalsiyum konsantrasyonunu düşürür, kontraksiyonu sonlandırır. Dolayısıyla miyokardiyal gevşemede kritik bir konumdadır. SERCA, kalsiyum iyonlarının önemli bir kısmını sarkoplazmik retikuluma pompalar. Geriye kalan iyonlar ise Na^{+} - Ca^{+2} antiport mekanizması (NCX), plazma membranı Ca^{+2} ATPaz'ı ve mitokondriyal Ca^{+2} uniport mekanizması ile uzaklaştırılır. Hem Tip I hem de Tip II rodent diyabet modellerinde kalsiyum homeostazisine katılan tüm taşıyıcıların ekspresyon ve aktivitelerinde değişimler görülür (Bers, 2002; Trost ve ark., 2002).

b) Değişen substrat kullanımı ve miyokardiyal lipotoksisite

Diyabetiklerde, özellikle visseral yağlanması fazla olan hastalarda, belirgin olarak görülen temel bozukluklardan birisi adipoz dokudan trigliserit ve esterleşmemiş yağ asitlerinin (NEFA) salınımında meydana gelen belirgin artıştır.

Sağlıklı (non-diyabetik), bireylerde kalbin enerji gereksinimi yaklaşık eşit oranlarda glukoz ve yağ asidi metabolizmasından karşılanır (Acar ve ark., 2011). Kan NEFA düzeyinin artışı miyokardiyumun glukoz alımı ve kullanımı yerine yağ asidi alım ve

kullanımına doğru kaymasına neden olur. Bu olaya “metabolik kayma” (metabolic shift) adı verilir (Carrol ve ark., 2005; Lopaschuk, 2002). Pozitron emisyon tomografisi (PET) yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada Tip I diyabetli hastalarda artmış miyokardiyal yağ asidi kullanımı azalmış glukoz oksidasyonu gösterilmiştir. Bu değişimin sebebi kalp kasında bulunan glukoz taşıyıcı proteinler GLUT1 ve GLUT4’ün seviyelerinde meydana gelen azalmalardır (Herrero ve ark., 2006).

Kardiyak miyositler, dolaşımdaki NEFA seviyesinin yükselmesine cevaben β -oksidasyon enzimlerinin miktarını arttırırlar. Glukoz oksidasyonuna kıyasla NEFA’ların oksidasyonu daha fazla ATP üretmekle birlikte çok fazla miktarda oksijen tükettiği için, kardiyak verimin düşmesine neden olur (Dirkx ve ark., 2011; Mazumder ve ark., 2004;). Ek olarak NEFA alımı mitokondriyal β -oksidasyon kapasitesinin üzerinde olabilir. Bu durumda lipid moleküller trigliserit formuna dönüşerek miyositlerde birikir (Sharma ve ark., 2004; Szczepaniak ve ark., 2003). Bu birikim, kalp kasını lipid metabolitlerinin toksik etkilerinden korumak ve oksidasyon için yakıt depolamak amaçlı yapılsa da nihayetinde lipid oksidasyonu ile lipid birikimi arasındaki dengesizlik morfolojik değişimlere (Nakayama ve ark., 2001; Yazaki ve ark., 1999) ve miyokardiyal fonksiyon bozulmalarına yol açar (Abe ve ark., 2002).

Unger (2002), sadece adipositlerin aşırı yağ biriktirme yeteneğine sahip olduğunu, diğer dokulardaki hücrelerde biriken yağın lipotoksik hasara yol açtığını ilk ortaya atan kişidir (Unger, 2002). Bugün lipotoksisite kavramı NEFA’ların adipoz doku haricindeki dokularda birikimini tanımlamak için kullanılmaktadır.

Miyokardiyal lipotoksisitenin yanı sıra, NEFA artışı pirüvat dehidrogenaz enzimini de inhibe ederek apoptozise direkt katkıda bulunan seramid sfingolipidinin üretimini arttırır. Bu toksik lipid ürünü palmitoil CoA ve serin amino asidi arasında gerçekleşen tepkime ile sentezlenir (Halse ve ark., 2001). Yapılan çalışmalarda seramid seviyesi artışının nükleer faktör $\kappa\beta$ ve kaspaz 3’ü aktive ederek, apoptotik etkiler gösterdiği ortaya konulmuştur (Zhang ve ark., 2001).

Peroksizom-Proliferatörle Aktive Olan Reseptörler (PPARs) hücrede artan yağ asidi seviyesine duyarlı transkripsiyon faktörleridir. Önemli hedef genleri aktive ettikleri için lipid metabolizmasında kilit role sahiptirler. Ligand ile aktive olan bir transkripsiyon faktörü olan PPAR- α yağ asidi metabolizmasının ana düzenleyicisidir. Enerji ihtiyacını ağırlıkla yağ asidinden karşılayan dokularda bol bulunur (kalp, karaciğer, böbrek ve iskelet kası gibi). PPAR- α 'nın kardiyak yağ asidi bağlayan protein, lipoprotein lipaz ve CD36 gibi yağ asidi metabolizması açısından önemli proteinleri regüle ettiği bilinmektedir (Bordun ve ark., 2014). Ek olarak PPAR- α pirüvat dehidrogenaz kinaz 4 ekspresyonunu arttırarak glukoz oksidasyonunu azaltır ve mitokondriyal yağ asidi alımını arttırır. Artmış mitokondriyal yağ asidi alımı oksijen tüketiminin artışına neden olacağı için ROS üretimini arttırır. ROS artışı mitokondriyal çiftlenimin bozulmasına neden olur, çiftlenim bozulması mitokondriyal enerji rezervini azaltarak kontraktıl disfonksiyona katkıda bulunur (Boudina ve Abel, 2006).

PPAR- α overekspresyonu olan farelerde mitokondriyal yağ asidi oksidasyon oranının arttığı, glukoz alım ve oksidasyonunun azaldığı gösterilmiştir. Bu değişimin sol ventrikülde fonksiyonel anomalilere yol açtığı belirtilmiştir (Finck ve ark., 2002).

c) Renin – Anjiyotensin – Aldosteron aksındaki bozulmalar

Diyabetik kalplerde anjiyotensin-II mRNA'sının ve reseptör yoğunluğunun artış gösterdiği bilinmektedir. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron aksının patolojik aktivasyonu, diyabetik kalplerde görülen artmış oksidatif hasar, kardiyomiyosit ve endotelial hücre apoptozisi ile yakından ilişkilidir (Fiordaliso ve ark., 2000; Khatter ve ark., 1996).

Streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda renin-anjiyotensin sisteminin blokajı sarkoplazmik kalsiyum homeostazisini düzelterek kardiyak disfonksiyonda iyileşme sağlamıştır (Liu ve ark., 2006). Paralel bir çalışmada renin-anjiyotensin sistemi blokajının; diyabette görülen sarkoplazmik retikulum kalsiyumun yüklenmesindeki bozulmaları ve ryanodin reseptör azalmasını düzelttiği gösterilmiştir (Yaras ve ark., 2007). Aynı zamanda renin-anjiyotensin sisteminin

blokajı ROS üretimini de azaltır. STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda antioksidan tedavi uygulaması ile benzer etkiler gösterir (Fiordaliso ve ark., 2006).

d) Bakır metabolizmasında meydana gelen değişimler

Diyabetli hastalarda serum bakır seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Hatta hipertansiyon ve mikrovasküler komplikasyonu olan diyabetli bireyler daha belirgin gözlenmektedir (Walter ve ark., 1991). Hiperglisemi serüloplazmin ve albüminin bakır bağlama kapasitelerini azltarak ekstrasellüler matrikste bakır seviyesini artırır (Argirova ve Ortwerth, 2003). Aynı zamanda glikozile olan proteinler bakıra daha yüksek affinite gösterirler. Bu nedenle ekstrasellüler matrikste bakırın artışı oksidasyon-redüksiyon sistemini aktive eder. Bu aktivasyon serbest radikal oluşumunu arttırarak oksidatif stres ve fibroze neden olur (Eaton ve Qian, 2002)

e) Kardiyak otonomik nöropati

Diyabetik kardiyovasküler otonomik nöropati, sempatik innervasyon, adrenerjik reseptör ekspresyonu ve miyokardiyumdaki katekolamin seviyelerindeki değişimler sonucunda gelişir. Klinik olarak dinlenim taşikardisi, ortostazis, egzersiz toleransının düşüşü ve gizli miyokardiyal infarktüs ile karakterizedir. Diyabetlilerde görülen yüksek ventriküler fibrilasyon prevalansı bu kişilerdeki yüksek sempatik tonus ile açıklanabilir. Aynı zamanda diyabetik otonomik nöropati bradiaritmilere ve iletim anomalilerine de neden olabilir (Mohaved, 2007).

f) Protein Kinaz C (PKC) yolağında meydana gelen değişimler

PKC yaklaşık 12 üyesi olan bir serin/threonin kinaz ailesidir (Mellor ve Parker, 1998). Fosfolipaz-C tarafından indüklenen intrasellüler Ca^{+2} ve diaçilgliserol (DAG) artışı PKC'yi aktive eder. Bu aktivasyon artmış endotelial hücre permeabilitesi, apoptozis, anjiyogenezis, düz kas hücresi ve kardiyomiyosit büyümesi, kontraksiyon artışı gibi kardiyovasküler fonksiyon ile ilgili birçok yolağı tetikler.

Hiperglisemik ortamda kültüre edilen vasküler hücrelerde veya diyabetik hayvanlardan elde edilen vasküler dokularda DAG (diaçilgliserol) ile aktive olan PKC sinyal yolağının aktivasyonunun arttığı gösterilmiştir. Ek olarak hipergliseminin yarattığı PKC aktivasyonu direkt olarak anjiyotensin converting

enzyme (ACE) enziminin aktivitesini artırır. ACE anjiyotensin I'i potent vazokonstriktör bir peptid olan anjiyotensin II'ye çeviren enzimdir (Gerald ve King, 2010).

Son çalışmalar, bir PKC- β inhibitörü olan ruboxistaurin mesylate (LY33353), üzerinde yoğunlaşmaktadır. PKC- β inhibisyonunun kardiyak hipertrofiyi geriye döndürdüğü, fraksiyonel kısalmayı arttırdığını ve fare transjenik kardiyak PKC- β modelinde kardiyak hipertrofiyi azalttığı gösterilmiştir (Wakasaki ve ark., 1997).

g) Endotelial hücre disfonksiyonu

Endotelial hücre disfonksiyonu (EHD), endotelium kaynaklı vazokonstriktör ve vazodilatör maddeler arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanabilir (Iqbal ve ark., 2014). Damar içerisinden gelen fiziksel veya kimyasal karakterli uyarılar endotel hücrelerinin üzerinde bulunan reseptörler tarafından algılanır, cevaben damar şeklinde değişim veya nitrik oksit (NO), endotelin-1, anjiyotensin-II, plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1), von-Willebrand faktör(vWF) gibi gerekli regülatör mediyatörlerin salınımı gerçekleşir, damar homeostazisi korunur (Esper ve ark., 2008).

Fizyolojik koşullarda bu mediyatörler dengeli bir şekilde salınır. Ancak diyabet bu faktörler arasındaki dengeyi bozarak vasküler end-organ hasarına neden olacak silsileyi başlatır (Tan ve ark., 2002). EHD hem mikrovasküler (retinopati, nefropati, nöropati) hem de makrovasküler (kalp hastalıkları, inme, periferik arter hastalıkları) komplikasyonların gelişiminde rol aldığı için diyabetik kardiyomiyopati patogenezinde önemli bir yer işgal eder (Creager ve Luscher, 2003). Çoğu deneysel çalışma, EHD'nin hiperglisemi kaynaklı geliştiğini ortaya koymaktadır (Brownlee, 2005; Wold ve ark., 2005).

h) HIF-VEGF-anjiyogenez aksındaki bozulmalar

Anjiyogenez, endotelial hücre migrasyon ve proliferasyonu, ekstrasellüler matriks yıkımı, perisit ve makrofajların birikimi, düz kas proliferasyon ve migrasyonu ve yeni damar oluşumu aşamalarını içerir (Joffe ve ark., 1999). Vasküler Endotelial

Büyüme Faktörü (VEGF), Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) gibi birçok büyüme faktörü iskemiye verilen anjiyogenik cevapta rol alırlar.

Diyabette neovaskülarizasyonda bozulmalar görülür. Bu bozulmalar, retina (retinopati) ve damar duvarlarında (anstable aterosklerotik plak) aşırı artmış anjiyogenez şeklinde gerçekleşebildiği gibi, yara iyileşme bozukluğunda olduğu gibi azalmış anjiyogenez şeklinde de gerçekleşebilir. Yine diyabette kemik iliğinden endotelial progenitor hücrelerin salınımında azalma ve salınan hücrelerinde fonksiyonel açıdan defektli olması, miyokartta azalmış VEGF ve VEGFR ekspresyonu ve artmış anjiyostatin (bir anjiyogenez inhibitörü) kardiyovasküler riski arttıran faktörlerdir (Hoit ve ark., 1999).

Çeşitli çalışmalar, diyabetik hastaların miyokartlarında VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFR-2 (Flk-1) ekspresyonu ve aktivasyonunun azaldığını ayrıca Akt-1 ve eNOS aktivasyonlarının da düşüş gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Trost ve ark., 2002; Przygodzki ve ark., 2013).

Diyabetik hayvanların miyokardiyumlarında VEGF ve her iki reseptörünün (VEGFR-1 ve VEGFR-2) mRNA'sının %40-70 oranında azaldığı gösterilmiştir (Lahaye ve ark., 2010). Bu bilgiye paralel olarak, diyabetik hastaların ventriküllerinde VEGF ve VEGFR-2 ekspresyonlarının iki kat azaldığı bildirilmiştir. Hem VEGF hem de reseptörünün azalışı diyabetik koşullarda miyokardiyumdaki yetersiz kollateral oluşumundan sorumludur (Yu ve ark., 2012). Ayrıca diyabetik hayvanlarda, miyokardiyumun aksine retina ve glomerüllerde VEGF ve reseptörleri iki kat artış gösterir. Bu artış retinadaki kapiller geçirgenlik artışını ve artmış neovaskülarizasyonu açıklamaktadır (Cao ve ark., 2012).

1.1.5 Streptozotosin ile İndüklenen Diyabetik Kardiyomiyopati Modeli

Diyabetik kardiyomiyopati deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda da gözlenmektedir. Pankreas beta hücreleri için toksik olan STZ ile deneysel olarak Tip I diyabet oluşturulan sıçanlarda diyabetik kardiyomiyopati gelişmektedir. Diyabet oluşumunu takiben 5. haftada bazal kontraktıl disfonksiyonun başladığı, 6. haftadan itibaren diyabetik kardiyomiyopatinin tamamen geliştiği ortaya konmuştur (Joffe ve ark., 1999; Hoit ve ark., 1999; Trost ve ark., 2002).

Przygodzki ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada STZ enjeksiyonu ile oluşturdukları 8 haftalık diyabeti takiben Langendorff düzeneği kullanarak koroner kan akımı parametrelerini incelemişler, endotel bağımlı vazorelaksasyon cevabında diyabetli grupta önemli azalma gözlemişlerdir. Bu veriler diyabetik kardiyomiyopatinin koroner dolaşımında bozulmaya yol açtığını göstermektedir (Przygodzki ve ark., 2013).

1.2. Yüksek İrtifa ve Hipoksi

Hipoksi kelime anlamı olarak “oksijen azlığı” demektir. Tıbbi literatürde ise oksijen desteğinin vücudun oksijen ihtiyacından az olması şeklinde tanımlanır. Hipoksinin dört türü vardır:

- a) Hipoksik hipoksi: Akciğerdeki yetersiz oksijen değişiminden kaynaklanır. Yükselti ile birlikte inspire edilen oksijenin bağıl olarak azalması veya akciğerden oksijen geçişini engelleyen bir patolojinin (pnömoni, pulmoner ödem, astım gibi) varlığından kaynaklanır.
- b) Anemik hipoksi: Vücudun varolan oksijeni dokulara iletemediği durumda ortaya çıkan hipoksi türüdür. Akut veya kronik anemi durumlarında, karbon monoksit zehirlenmelerinde ve orak hücreli anemide görülen hipoksi tipidir.
- c) İskemik hipoksi: Yetersiz kan akımı kaynaklı hipoksi türüdür. Kalp yetmezliği, hipovolemi gibi nedenlerden kaynaklanabilir.

- d) Histotoksik hipoksi: Dokuların ulaştırılan oksijeni kullanma kapasitelerini yitirdikleri hipoksi türünün ismidir. Siyanür zehirlenmesi örnek teşkil eder (Murkowski ve ark., 2006).

Yükselti ile atmosferdeki oksijen yüzdesi değişmemekle birlikte düşen atmosfer basıncına bağlı olarak kısmi oksijen basıncı azalma gösterir. Yüksek irtifada yaşıyan popülasyonlar sürekli hipoksik hipoksiye maruz kalmaktadır. Yüksek irtifanın kesin bir tanımı olmamakla birlikte genel kabul, hipoksi kaynaklı regülatuvar değişimlerin 3000 metre ve üzerinde gerçekleştiği yönündedir (West, 2007). Ancak literatürde yükselti eşiğini 1500 metreye kadar indiren görüşler de mevcuttur (Burtscher, 2014). Günümüzde yüksek irtifada yaklaşık 140 milyon insan yaşamaktadır. Eğer yükselti 1500 metreye indirilirse bu sayı 400 milyona ulaşmakta; turistik, ticari veya askeri amaçlarla geçici sürelerle yüksek irtifada bulunanlar ile daha da artmaktadır. Bu nedenle yüksek irtifada insan fizyolojisinde meydana gelen değişimlerin araştırılması önemli bir toplum sağlığı konusudur. Şüphesiz ki yüksek irtifada çevre koşullarında meydana gelen tek değişiklik oksijen basıncının azlığı değildir. Yükselti ile birlikte UV-radyasyon artışı, hava kirliliği, sıcaklığın ve nemin azalması hipoksiye eşlik eder. Ek olarak yüksek irtifada yaşıyan popülasyonların bazılarının etnik kökenlerinden ötürü taşıdıkları genetik varyasyonlar (örn. *Sherpa* yerlileri) göz ardı edilmemelidir. Ancak yine de yüksek irtifada meydana gelen regülatuvar değişimlerin büyük bir bölümünün hipoksi kaynaklı olduğu söylenebilir.

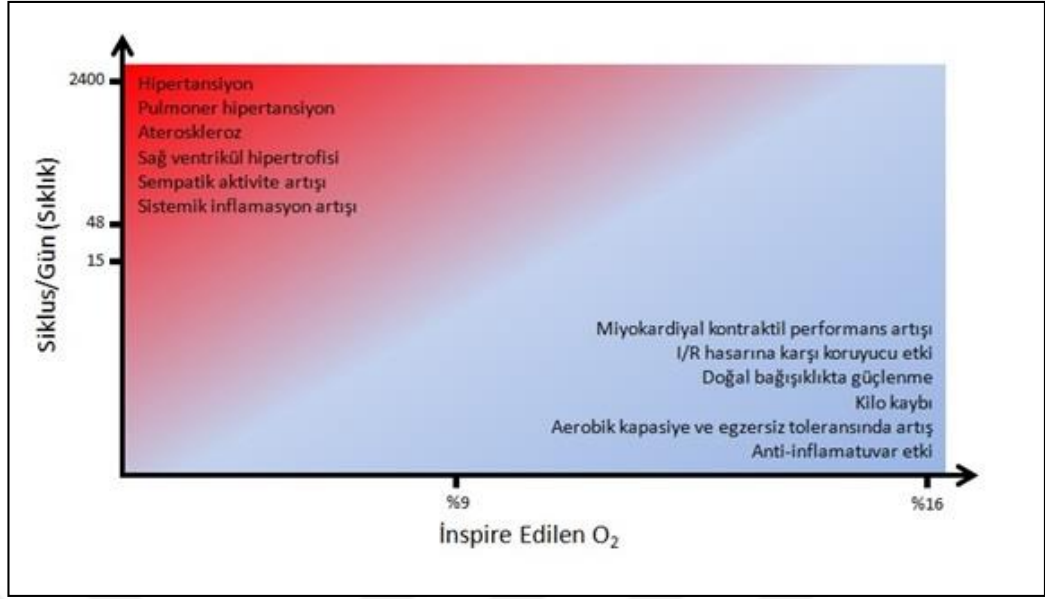
Yüksek irtifanın etkilerine yönelik ilk çalışmalar yüksekte yaşıyan popülasyonlar ile deniz seviyesine yakın irtifada yaşıyan popülasyonların epidemiyolojik özelliklerini karşılaştıran çalışmalardır. Ramos ve ark. (1997), And dağlarında 4260 m yüksekte yaşıyan 300 insanda yaptıkları post-mortem çalışmada miyokart infarktüsüne (Mİ) ve koroner arter hastalıklarına (KAH) hiç rastlamamışlardır (Ramos ve ark., 1967). Voors ve Johnson (1979), Amerika Birleşik Devletleri'nin 100 büyük şehrinden 99'unda KAH ve Mİ bağımlı mortalitenin yükselti ile azaldığını göstermişler ve bu azalmanın erkeklerde %72 gibi bir oranla daha baskın olduğunu bildirmişlerdir (Voors ve Johnson, 1979). İsviçre ve Yunanistan'ın dağlık bölgelerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda da paralel veriler bulunmuştur (Baibas ve ark., 2005;

Faeh ve ark., 2009). Çalışmaların hepsindeki genel eğilim KAH ve Mİ kaynaklı mortalite oranlarının 900 metreye kadar değişim göstermediği ama 900 metreden sonra azalmaya başladığı yönündedir.

Yüksek irtifanın epidemiyolojik açıdan gösterilen kardiyoprotektif etkisinin altında yatan mekanizma araştırmacılar için oldukça cazip bir araştırma alanı olmuştur. Yüksek irtifada yapılan bilimsel çalışmalar ve laboratuvar koşullarında insan denekler ve deney hayvanlarına uygulanan sayısız varyasyona sahip hipoksi protokolleri ile bu alandaki bilgi arttırılmaya çalışılmıştır. Bu protokollerin akut, kronik ve aralıklı (intermittent) hipoksi olmak üzere üç farklı tipte uygulandığı görülmektedir.

1.2.1. Aralıklı Hipoksi

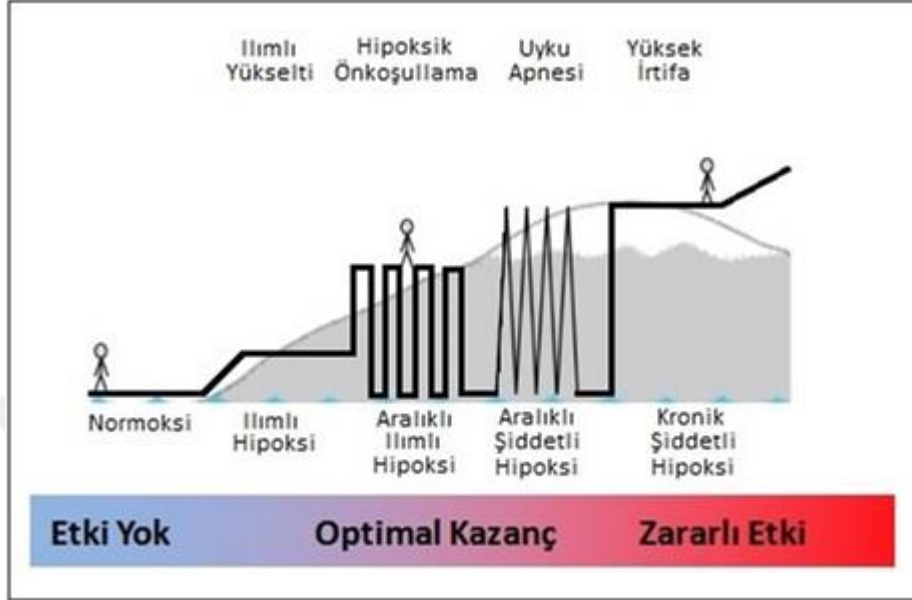
Aralıklı hipoksi, tekrarlı düşük oksijen (hipoksi) seanslarının normoksik periyotlar ile birbirinden ayrılması olarak tanımlanır. Ancak aralıklı hipoksinin sınırları konusunda tam bir görüş birliğine varılamadığı gibi fizyolojik etkileri ile ilgili veriler de çelişkilidir. Literatürde araştırmacının perspektifine bağlı olarak değişiklik gösteren çok sayıda protokol bulunmaktadır. Bu protokoller birbirlerinden beş farklı düzlemde ayrılırlar: 1) Hipoksinin şiddeti (inspire edilen oksijen %2 - %16) 2) Hipoksik epizotun süresi (15-30 saniye - 12 saat) 3) Günlük hipoksi/reoksijenizasyon sikluslarının sayısı (3 - 2400) 4) Hipoksi uygulama şekli (Günlük birden fazla epizotlar veya haftada 3 gün vb.) 5) Protokolün toplam süresi (2-90 gün). Biriken veriler göz önüne alındığında ılımlı hipoksi (inspire edilen O₂ %9-16), düşük epizot sayısı (3-15 epizot/gün) yararlı etkilere sebep olurken, şiddetli hipoksi (inspire edilen O₂ %3-8) ve yüksek epizot sayısı (48-2400 epizot/gün) patolojik etkilere sebep olmaktadır. (Opazo-Navarrete ve Mitchell, 2014) (Bkz Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Aralıklı hipoksi uygulamasının şiddet ve sıklığının olumlu ve olumsuz etkileri (Opazo-Navarrete ve Mitchell, (2014)’den değiştirilmiştir.)

Klinikte, aralıklı hipoksi obstrüktif uyku apnesi sendromunun (OSAS) en temel karakteristik özelliğidir. Tekrar eden desatürasyon-reoksijenizasyon sekanslarının oksidatif strese neden olduğu ve OSAS’ın ortaya çıkardığı sistemik yan etkilerden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Lavie, 2003). Aralıklı hipoksinin OSAS’ın temel zarar verici ögesi olduğunu düşünen görüşün yanı sıra ılımlı OSAS’ın iskemi/reperfüzyon olaylarında koruyucu bir etki oluşturduğunu öne süren çalışmalar da bulunmaktadır (Steiner ve ark., 2010; Lavie ve Lavie, 2006) (Bkz. Şekil 1.2). Shatilo ve ark. (2008), 60-74 yaş arası sağlıklı erkeklerle yaptıkları normobarik aralıklı hipoksi çalışmasında, hipoksi uygulamasıyla ortalama kan basıncı değerlerinin azaldığını ($7,9 \pm 3,1$ mmHg) ve submaksimal egzersiz kapasitesinin arttığını (anaerobik eşikteki iş yükünde %12,7 artış) göstermişler, hipoksik koşullamanın sedanter ve yaşlı erkeklerdeki olumlu kardiyovasküler etkilerine dikkat çekmişlerdir (Shatilo ve ark., 2008). Bailey ve ark. (2000), aralıklı hipoksik önkoşullama ile egzersizi birleştirdikleri çalışmada, 34 adet fiziksel açıdan aktif katılımcıyı hipoksik ve normoksik egzersiz grubu olmak üzere iki ayrı gruba ayırmışlar, hipoksi+egzersiz grubunun maksimal egzersiz sistolik basınçlarının 10 ± 9 mmHg daha düşük olduğunu ve maksimal oksijen tüketimlerinin $0,47 \pm 0,77$ L/dakika arttığını göstermişlerdir (Bailey ve ark., 2000). Spor hekimliğinde, aerobik egzersiz performansını arttırmak için “hipoksik antrenman” denilen antrenman

stratejisi (yüksekte yaşa, alçakta antrenman yap) çok uzun yıllardır kullanılmaktadır (Fulco ve ark., 2000).



Şekil 1.2. Hipoksi şiddetinin olumlu ve olumsuz etkileri (Verges ve ark., 2015’den değiştirilerek alınmıştır).

1.2.2. Hipoksik Önkoşullama

Aralıklı hipoksinin olumlu etkilerini açığa çıkarmak için hipoksik önkoşullama yöntemi sıklıkla kullanılır. Önkoşullama, bir dokuya uygulanan eşik altı bir zararlı stimulusun, aynı veya benzer karakterli eşik üstü zararlı stimuluslara olan direnci arttırmasına verilen addır. Hipoksik önkoşullama ılımlı şiddetteki hipoksinin aralıklı epizotlarla uygulanmasına dayanır; organizmanın oksijen yokluğunda kullandığı vasküler, metabolik ve nörolojik düzlemdeki karmaşık savunma stratejilerini harekete geçirmeyi amaçlar. İlk kez Shizukuda ve ark. (1992), iskemi öncesi uygulanan hipoksinin de iskemik önkoşullama gibi olumlu etkileri olduğunu ortaya koymuş ve hipoksik önkoşullama terimini ortaya atmışlardır. Öncü çalışmalarında araştırmacılar köpek kalbini hipoksik kan ile perfüze ederek hipoksik önkoşullama yapmışlar, bu sayede iskemi/reperfüzyona karşı koruyucu etki elde etmişlerdir (Shizukuda ve ark., 1992). Hipoksik önkoşullamanın iskemik atakta meydana getirdiği koruyucu etki takip eden birçok hayvan çalışması ile gösterilmiş ve

hipoksik önkoşullamanın potansiyel bir non-farmakolojik tedavi yöntemi olduğu ileri sürülmüştür (Verges ve ark., 2015).

1.2.3. Hipoksik Önkoşullama ve HIF

Akut veya tekrarlı hipoksik koşullama, uygulamayı takiben gen ekspresyon profilinde çeşitli değişimlere neden olur. Genomik düzeyde meydana gelen bu cevaptan temelde hipoksi ile indüklenen faktör (HIF-1) sorumludur. HIF-1 hücrel oksijen homeostazisinde temel regülatör görevi gören bir transkripsiyon faktörüdür. HIF-1 eksikliği olan farelerde iskemi ile indüklenen kardiyoprotektif cevabın kaybolması, HIF-1 ve hedef genlerinin iskemik/hipoksik koşullamadaki rolünün önemini göstermektedir (Cai ve ark., 2008). Belaidi ve ark. (2007), yaptıkları sıçanlarla yaptıkları çalışmada HIF-1 aktivasyonunu engelleyerek akut aralıklı hipoksiyi (AH) takiben gelişen kardiyoproteksiyon cevabını ortadan kaldırmışlardır (Belaidi ve ark., 2007). Yakın zamanlarda yapan bir diğer çalışmada HIF-1 inhibisyonunun AH kaynaklı nöroproteksiyonu da engellediği gösterilmiştir (Huang ve ark., 2014). Nitrik oksidin önkoşullamada ve vazodilatör etkilerine bağlı olarak gelişen sitoproteksiyonda kritik rol oynadığı bilinmektedir. Aynı zamanda mitokondri fonksiyonunu da modüle eder (Murillo ve ark., 2011). Gess ve ark. (1997), HIF-1'in ve bir HIF-1 hedef geni olan indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) geninin akut AH uygulamasını takiben upregüle olduğunu ve NO'nun kardiyoprotektif etkilerin oluşmasına katkı sağladığını göstermişlerdir (Gess ve ark., 1997). HIF-1'e ek olarak, apoptotik yolların regülasyonunu sağlayan GATA-4'ün de akut AH uygulamasını takiben farelerde, bcl-2 ve bcl-x(L) gibi antiapoptotik genlerin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Park ve ark., 2007).

Her ne kadar reoksijenasyonu takiben HIF-1 hızla yıkıma uğrasa da AH'nin tüm vücutta yol açtığı HIF-1 aktivasyonu AH maruziyetinden sonra da devam eder. Bu süregelen aktivasyon tekrarlı desatürasyon-oksijenasyon siklusları sonucunda artan oksidatif stres ile açıklanmaktadır. ROS HIF-1'in oldukça potent bir uyarıcısıdır; hem HIF-1 α proteinin ekspresyonunu arttırarak hem de PHD-bağımlı HIF-1 degradasyonunu azaltarak HIF-1 aktivitesini arttırır. HIF-1 tarafından upregüle

edilen diğer koruyucu genlerin yanı sıra uzun dönem hipoksik uygulama VEGF, anjiyopoietin ve platelet-kaynaklı büyüme faktörleri gibi anjiyogenik cevapta rol alan faktörlerin de upregülasyonunu sağlar (Semenza, 2009). Kronik AH'ya maruz kalan sıçanların sol ventrikül kapilleritesinde 1,5 kat artış gösterilmiş ve buna bağlı olarak izole kalplerde koroner akımın pre-iskemik koşullarda arttığı bildirilmiştir. Bu artış I/R hasarı sonrası toparlanmaya da katkı sağlamıştır (Zhong ve ark., 2002). Anjiyogeneze meydana gelen bu artış sadece sitoproteksiyona katkıda bulunmakla kalmaz aynı zamanda proteksiyonun akut koşullama protokolleriyle elde edilen süreden daha uzun olmasını açıklar.

İskemik dokularda hücreleri hipoksinin yol açtığı zarardan korumaya yönelik yolları aktive eden HIF sisteminin tedavi veya koruyucu amaçlı aktive edilmesi sık uygulanan bir stratejidir. HIF cevabını indükleyebilmek için bir dizi metod önerilmektedir. Bunlar arasında aralıklı hipoksi uygulaması ile yapılan HIF indüksiyonu, HIF'in genetik aktivasyonu, CoCl₂ gibi hipoksi durumunu taklit eden ajanların kullanımı, DMOG gibi prolil hidroksilaz blokörlerinin kullanımı ve ılımlı egzersiz uygulaması ile HIF-1 arttırımı sayılabilir (Tekin ve ark., 2010).

1.3. HIF-VEGF-Anjiyogeneze Aksı

Oksidatif fosforilasyon yapan canlılar için kesintisiz oksijen desteği oldukça yaşamsaldır. Oksijenin vücuda dağılımı ile ilgili sistemlerin (solunum ve dolaşım sistemi) oksijen düzeyi ile kontrol edildiği fikri oldukça eskiye dayanmaktadır. J.S. Haldane'ın yaklaşık yüz yıl öncesinde ventilasyonun yükselti ile birlikte arttığını gösterdiği çalışmaları bu alanda bir ilktir. Günümüzde artık sadece solunum ve dolaşım sisteminin değil tüm sistemlerin hem hücresel hem de sistemik düzeyde oksijen düzeyinden etkilendikleri bilinmektedir.

1.3.1. Hipoksi ile İndüklenen Faktör (HIF)

Hipoksi “oksijen azlığı” anlamına gelmektedir. Dokuların fizyolojik O₂ konsantrasyonları doku tipine göre değişkenlik göstermekle birlikte atmosferik oksijen basıncından farklıdır. Örneğin arter kanının normal PO₂'si %14 iken miyokardiyum için bu oran %10'dur. İskelet kasında %5, kemik iliği, timüs bezi ve kıkırdak dokuda ise %1'in dahi altına düşmektedir (Krock ve ark., 2011; Yun ve ark., 2005). Oksijenin ilgili dokudaki fizyolojik düzeyinin altına düşmesine “doku hipoksisi” adı verilir. Hipoksinin hücresel düzeydeki etkilerinin açığa çıkmasındaki temel aracı molekül HIF (Hypoxia Inducible Factor) molekülüdür. İlk kez Semenza ve Wang (1992),’ın yaptığı öncü çalışma ile Hep38 insan hepatoma hücrelerinin nükleuslarında keşfedilmiştir (Semenza ve Wang, 1992). Keşfedilen molekülün hipoksi ile düzeyinin arttığı ve eritropoietin’in gen bölgesini aktive ettiği gösterilmiş, “Hypoxia-induced-enhancer” olarak isimlendirilmiştir. Aynı araştırmacıların yaptıkları takip eden yayınlarda Hipoksi ile İndüklenen Faktör (HIF) olarak adlandırılarak bugünkü ismini almıştır (Wang ve Semenza, 1993).

HIF molekülü α (O₂ labil, O₂ sensitif) ve β (O₂ bağımsız) alt birimlerinden oluşan bir heterodimerdir. HIF α 'nın üç adet izoformu vardır. Bunlar HIF-1 α , HIF-2 α (EPAS1 = Endothelial PAS Domain Protein 1) ve HIF-3 α 'dır. HIF-1 β , aril hidrokarbon reseptörünün nükleer translokatorü (ARNT) geninin bir ürünüdür. ARNT geninin 774 ve 789 amino asitten oluşan iki adet ARNT izoformunu kodladığı bilinmektedir (Hoffman ve ark., 1991). ARNT proteini (HIF-1 β), hipoksi koşulunda HIF-1 α ile birleşerek HIF molekülünü oluşturur. HIF-1 α ve HIF-1 β 'nın tek başına DNA bağlama yeteneği yoktur, fonksiyonel olmaları için dimer oluşturmaları gerekmektedir.

HIF-1 α ile oksijen konsantrasyonu arasındaki ilişki birçok deneysel çalışma ile incelenmiştir. Semenza ve ark. (1997),’nın yaptıkları çalışmada oksijen konsantrasyonunun %20'den %0,5'e düşmesinin HIF- 1 α ve HIF-1 β alt birimlerinin bağlanma hızını üstel olarak arttırdığı ortaya konulmuştur (Semenza ve ark., 1997). Hem hipoksik hem de non-hipoksik hücrelerde HIF-1 β , HIF-1 α 'ya kıyasla aşırı

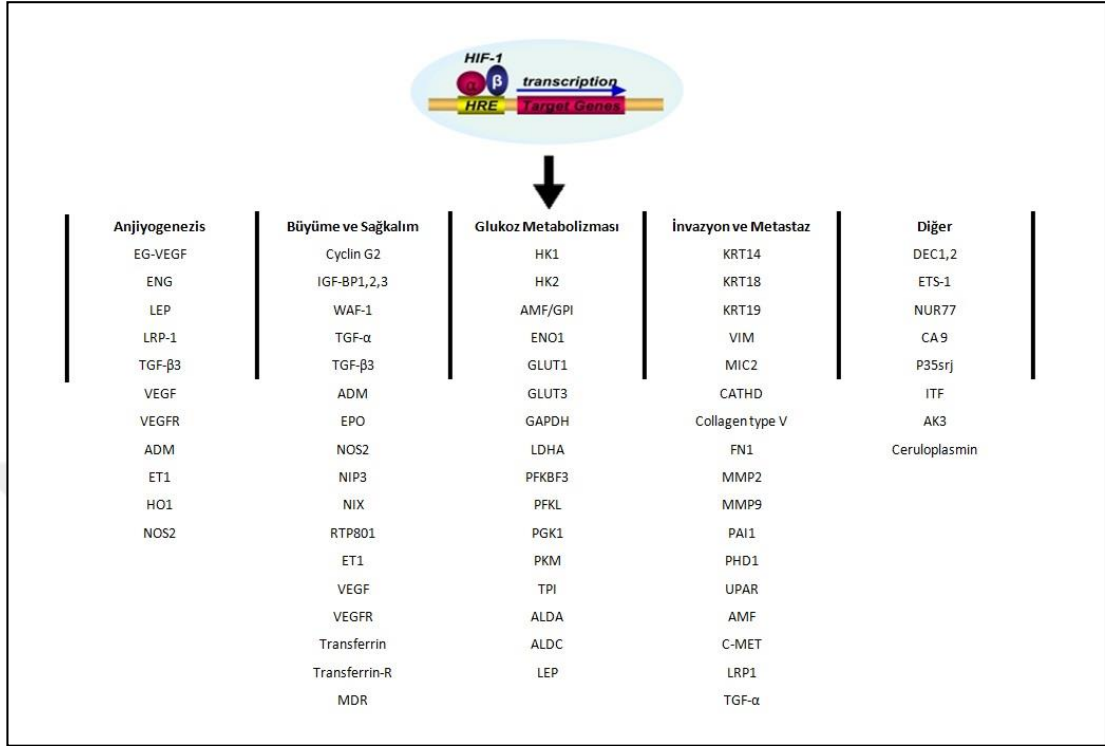
miktarda bulunur. Bu nedenle HIF molekülünün oluşumunda HIF-1 α miktarı hız kısıtlayıcı basamaktır (Jiang ve ark., 1996). Blot hibridizasyon tekniği kullanılarak yapılan çalışmalarda HIF-1 mRNA'sının beyin, kalp, böbrek, pankreas, akciğer, karaciğer, plasenta ve iskelet kası da dahil olmak üzere tüm insan dokularında bulunduğu gösterilmiştir (Wiener ve ark., 1996).

Hücre içi, HIF-1 α düzeyi normoksiye yaklaşıldıkça azalan hipoksik koşullarda artan özelliktedir. Normoksik koşullarda HIF-1 α 'nın üzerinde bulunan oksijen-bağımlı degradasyon (ODD) bölümündeki iki spesifik prolin rezidüsü prolin-4 hidroksilaz grubu içeren enzimler (PHD) tarafından hidroksillenir. von Hippel Lindau tümör baskılayıcı geninin ürünü (pVHL) isimli protein bu hidroksiprolin rezidülerine bağlanır (Ivan ve ark., 2001; Jaakkola ve ark., 2001; Salceda ve Caro, 1997). Bu bağlanma asetil transferaz enzimini etkileyerek aynı bölgenin lizin rezidülerinin asetillenmesine yol açar (Jeong ve ark., 2002). pVHL-ODD bağlanması ve takip eden modifikasyonlar molekülün ubiquitin-ligaz kompleksi ile ilişki kurarak ubiquitinlenmesine yol açar. Çoklu ubiquitinlenme 26S ribozomlar için bir etiket oluşturarak HIF- α 'nın proteozomal degradasyonuna neden olur (Tanimoto ve ark., 2000; Cockman ve ark., 2000).

Proteolitik degradasyona ek olarak, bir başka oksijen bağımlı düzenleme mekanizması da HIF-1'i inhibe eden faktör (FIH-1) üzerinden gerçekleşir. Normoksik koşullarda FIH-1 HIF-1 α 'nın C terminal aktivasyon bölümünde bulunan asparjinil-803 rezidüsünü β -hidroksilasyona uğratar. C terminal aktivasyon bölümü HIF-1 α 'nın bir transkripsiyonel koaktivatör olan p300 ile ilişki kurduğu bölümdür, bu bölümün hidroksilasyonu HIF-1 α 'nın koaktivatörleri ile ilişkisini engeller (Lando ve ark., 2002).

Hipoksik koşullarda stabilize olan HIF-1 α sitoplazmadan nükleusa göç ederek HIF-1 β ile heterodimer oluşturur. Oluşan kompleks, DNA üzerinde bulunan ve hedef genlerin promoter bölgelerini içeren hypoxia-response element (HRE) sekanslarına bağlanır. HIF- α tek başına memeli hücrelerindeki proteinlerin %2'sinden fazlasını

kontrol eder (Bkz Şekil 1.1). Bu nedenle HIF-1 α çoğu kardiyoprotektif stratejinin merkezinde yer almaktadır (Hirota ve Semenza, 2006).



Şekil 1.3. HIF-1'in bazı alt hedefleri (Hong ve ark., 2004'den değiştirilerek alınmıştır).

1.3.2. VEGF ve Anjiyogenezis

VEGF ve anjiyogenez HIF birçok biyolojik yolağa ait genlerin ekspresyonunu düzenler. En iyi çalışılmış ve öne çıkan hedefleri anjiyogenez ve metabolizma ile ilgili yolaklardır. Hücrede oksijenin en yüksek verimde kullanımını sağlamak adına HIF fazla miktarda O₂ tüketen metabolik yolaklar yerine hücreyi glikoliz'e yönlendirir. Yapılan çalışmalar glikolitik enzimleri kodlayan genlerin hepsinin transkripsiyonunun HIF tarafından artırıldığını göstermektedir (Benita ve ark., 2009; Semenza, 2012). HIF aynı zamanda mevcut oksijenin daha verimli dağılımını sağlayacak olan EPO, VEGF, VEGF reseptörleri VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFR-2 (KDR/ Flk-1) gibi moleküllerin de artışına neden olur (Takeda ve ark., 2004). Oksijen homeostazisi ile ilgili bu yolaklara ek olarak HIF'in otofaji, apoptozis, redoks homeostazisi, inflamasyon ve immünite ile ilgili hedefleri de bulunmaktadır (Wenger ve ark., 2005; Chi ve ark., 2006; Mole ve ark., 2009; Semenza, 2012).

Damar oluşumu vaskülogenez ve anjiyogenez denilen iki farklı mekanizma ile gerçekleşir. Vaskülogenez, anjiyoblastlar denilen öncü hücrelerden yeni kan damarı oluşumu olarak tanımlanır. Embriyonik gelişim sırasında ilkin damar ağı vaskülogenez ile oluşur. Anjiyogenez terimi ise, mevcut damar ağından yeni damarların oluşumunu ifade eder. Anjiyogenez hem yetişkin organizmada hem de embriyoda gerçekleşir (Carmeliet, 2000).

Vasküler Endotelyal Growth Faktör izoformları (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D) anjiyogenezi kontrol eden temel moleküllerdir (Park ve ark., 1993). Hipoksi ve/veya HIF-1 ile indüklenen anjiyogenez cevabı, HIF-1'in VEGF'nin temel uyarıcı olması nedeniyle VEGF-bağımlıdır. Hipoksik koşullardaki HIF birikimi temel proanjiyogenik faktör olan VEGF'yi direkt olarak upregüle eder (Forsythe ve ark., 1996; Liu ve ark., 1995). VEGF Flt-1 ve KDR/Flk-1 reseptörlerini aktive ederek damar oluşum kaskadını başlatır (Gerber ve ark., 1997; Waltenberger ve ark., 1996).

Memelilerde üç adet VEGF reseptörü tanımlanmıştır. VEGF-R1 hematopoietik hücre gelişiminde, VEGF-R2 vasküler endotelyal hücrelerin gelişiminde, VEGF-R3 ise lenfatik endotelyal hücre gelişiminde görev alır. Gen susturma çalışmaları ile bu reseptörlerin selektif aktivasyon durumlarındaki davranışları incelenmiş ve damar endotelinde VEGFR-2'nin VEGF sinyalinin büyük bir bölümünü ileten temel reseptör olduğu ortaya konmuştur.

VEGF reseptörü, hücre yüzeyinde yer alan tirozin kinaz ile kenetli bir reseptördür. VEGFR-1 (Flt-1) hematopoietik kök hücrelerde, makrofajlarda ve vasküler endotelyal hücrelerde bulunurken, VEGFR-2 (Flk-1/KDR) vasküler endotelyal hücrelerde ve lenfatik endotelyal hücrelerde bulunur. VEGFR-3 (Flt-4)'ün ekspresyonu ise lenfatik endotelyal hücreler ile sınırlıdır.

Hipoksi devam ettiği sürece, VEGF reseptörlerine bağlanarak damarlanmayı uyarmaya devam eder. Ek olarak VEGF'nin PIGF ve FGF gibi diğer proanjiyogenik faktörler üzerinden de damarlanmayı uyardığı bilinmektedir.

Kardiyomiyosit spesifik PHD2 eksikliği olan farelerde kalbin kapiller yoğunluğunda bir artış olduğu bilinmektedir. Bu artış miyokardiyal infarktüs durumunda kardiyoprotektif etki gösterir (Holscher ve ark., 2011). Kalpte güçlü HIF aktivasyonunun olduğu diğer fare modellerinde de benzer bulgular elde edilmiştir (Holscher ve ark., 2011; Lei ve ark., 2008; Minamishima ve ark., 2009; Takeda ve ark., 2007). Transgenik PHD2 gt/gt farelerinde PHD2 ekspresyonu kardiyak endotelial hücrelerde %76, kardiyak fibroblastlarda %77 ve kardiyomiyositlerde %93 oranında azalma gösterir. Bu azalma HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın kalpteki stabilizasyonunu artırır. Bu hayvanların kalbinde bir kapillerite artışına rastlanmamakla birlikte koroner damarların anlamlı düzeyde genişleme gösterdiği bildirilmiştir. Bu genişleme iskemik hasarda kalp fonksiyonları üzerinde koruyucu etki sağlamıştır (Kerkela ve ark., 2013). Yapılan bir diğer çalışmada, PHD1, PHD2 ve PHD3 KO farelerin anjiyogenik fenotipleri araştırılmıştır. PHD1 ve PHD3 KO farelerde herhangi bir anjiyogenik fenotip bozukluğuna rastlanmazken PHD2 KO farelerde kan damarlarının yoğunluğunun artışı gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında PHD2'nin anjiyogenezin majör negatif düzenleyicisi olduğu ileri sürülmüştür (Wu ve ark., 2008).

1.3.3. Prolil Hidroksilazlar:

İlk HIF prolil-4-hidroksilaz grubu içeren enzim (PHD) *Caenorhabditis elegans* adlı canlıdan 2001 yılında izole edilmiştir (Epstein ve ark., 2001). PHD'ler demir ve 2-oksoglutarat-bağımlı dioksijenazlar süper ailesinin bir üyesidir. Takiben üç adet insan ortholog izoformu tanımlanmış ve PHD1 (prolil hidroksilaz [HPH]3), PHD2 (EGLN1, HPH2) ve PHD3 (EGLN3, HPH1) olarak isimlendirilmiştir. Dördüncü bir PHD formu olarak PHD ile ilişkili protein (PH-4) öne sürülmüş ancak fonksiyonel özellikleri henüz açıklığa kavuşturulamamıştır (Oehme ve ark., 2002). Üç bilinen PHD izoformu da (PHD1, PHD2, PHD3) moleküler oksijen varlığında HIF- α alt birimini hidroksiller. PHD tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyonlarda Fe²⁺ ve 2-oksoglutarat ile birlikte moleküler oksijen de kofaktör olarak görev alır. Oksijen

düzeyi PHD'nin aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir. Bu sayede PHD molekülleri hücrede bir oksijen düzeyi sensörü olarak görev yaparlar.

PHD1, PHD2 ve PHD3 değişken düzeylerde olmak kaydıyla tüm dokularda bulunur (Berra ve ark., 2006). Willam ve ark. (2006), hem normoksik hem de hipoksik durumda yaptıkları ölçümlerde Wistar cinsi sıçanların kalp dokularında her üç PHD izoformunun da bulunduğunu göstermişler, normoksi durumunda miktar sıralamasının PHD2>PHD3>PHD1, hipoksi durumunda ise PHD3≥PHD2>PHD1 şeklinde olduğunu bildirmişlerdir (Willam ve ark., 2006). PHD1 büyük oranda nükleusta bulunurken, PHD2 büyük oranda sitoplazmada bulunur ancak sitoplazma nükleus arası geçiş yapabildiği de bilinmektedir (Berra ve ark., 2003). PHD3 ise sitoplazma ve nükleusa eşit oranda dağılmıştır (Metzen ve ark., 2003). PHD'ler HIF-1α'yı hem sitoplazmada hem de nükleusta degrade edebilir (Berra ve ark., 2001).

Huang ve ark. (2002), en aktif PHD izoformunun PHD2 olduğunu ve onu sırasıyla PHD3 ve PHD1'in takip ettiğini bildirmişlerdir (Huang ve ark., 2002).

HIF-1α düzeyi PHD'ler tarafından kontrol edilmektedir. Bu nedenle PHD'lerin ekspresyon dinamikleri hücrenin hipoksiye verdiği cevapta oldukça önemlidir. PHD ekspresyonunu kontrol eden üç ana yoldan bahsetmek mümkündür. Bunlar:

- a) Hipoksi bağımlı/HIF bağımlı yolak: Hipoksinin PHD1 ve 3'ün gen ekspresyonları üzerindeki indükleyici etkisi del Paso ve ark. tarafından ortaya konulmuş ve hipoksinin bu etkiyi HIF üzerinden gerçekleştirdiği belirtilmiştir (del Paso ve ark., 2003). Aynı araştırmacılar PHD 1 ve 3 genlerinin promoter bölgelerinde HIF'in bağlandığı bölgeler bulunduğunu da saptamışlardır. Ancak PHD2'nin promoter bölgesinde böyle bir bağlanma alanı bulunmamaktadır.
- b) Hipoksi bağımlı/HIF bağımsız yolak: Tıpkı HIF-1α molekülünde olduğu gibi PHD1 ve PHD3 de proteozomal degradasyona uğrar. Seven in absentia homolog (Siah) 1, Siah 2 ve E3 ligaz enzimi HIF'den bağımsız olarak hipoksi ile indüklenir. Siah1 ve Siah 2 PHD1 ve PHD2'yi degrade eder (Banerjee ve ark., 2012).

c) Hipoksi bağımsız yolak: PHD ekspresyonu diğer fizyolojik uyaranlardan da etkilenmektedir. ZR75-1 meme kanseri hücrelerinde östrojenin PHD1 mRNA ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Banerjee ve ark., 2012).

İskemi-reperfüzyon hasarı, iskemik olayın öncesinde kalbe uygulanan kısa süreli ılımlı (sublethal) iskemik/ reperfüzyon döngüleri ile azaltılabilir. Bu uygulamaya iskemik önkoşullama (IPC) adı verilir.

IPC stimulusu iki farklı koruma penceresi oluşturur. İlk koruma penceresi diğer adıyla ‘klasik IPC’, IPC stimulusunu takiben ortaya çıkar ve 3-4 saat kadar sürer. İlk koruma penceresi geçildikten 12-24 saat sonra protektif etkinin tekrar ortaya çıktığı ve 72 saat kadar devam ettiği ikinci koruma penceresi (SWOP) diğer adıyla ‘gecikmiş IPC’ dönemine girilir (Kuzuya ve ark., 1993; Marber ve ark., 1993; Hausenloy ve Yellon, 2010). SWOP veya gecikmiş IPC’nin oluşabilmesi için spesifik kardiyoprotektif genlerin aktivasyonu gerekmektedir. Bu genlerin aktivasyonunda HIF-1 α ’nın temel mediatör olduğu düşünülmektedir.

Gecikmiş IPC’nin temel mediatörünün HIF-1 α olduğu hipotezini destekleyen ilk çalışma Cai ve ark. (2003), tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar kısmi HIF-1 α eksikliği olan (HIF-1 α +/-) farelerde gecikmiş IPC döneminin koruyucu etkilerinin kaybolduğunu göstermişlerdir (Cai ve ark., 2003). Tersine PHD’lerin genetik inaktivasyonu veya farmakolojik inhibisyonu HIF-1 stabilizasyonunu artırarak iskemik-reperfüzyon hasarına toleransı artırıcı etki gösterir (Hyvarinen ve ark., 2010; Holscher ve ark., 2011). Yeni yapılan çalışmalar HIF’in ilk koruma penceresi döneminde de etkili olduğu yönünde bulgular içermektedir (Cai ve ark., 2008).

1.4. Matriks Metalloproteinazları

Ekstrasellüler matriksin en önemli yapıtaşlarından olan kollajenlerin, matriks metalloproteinazları (MMP) izole edinceye kadar proteolitik olarak yıkılmadığı kabul edilmekteydi. İlk kez 1962 yılında kollajenolitik aktivitesini gözlemlenen MMP'ler (Gross ve Lapierre, 1962), takip eden yıllarda, Eisen ve ark. (1968) tarafından ilk defa insan dokusundan izole edilmiştir (Eisen ve ark., 1968). Bu öncü çalışmalar kollajenlerin statik bir iskelet yapısı olmadığı, yıkım ve yapım arasındaki dengenin kontrol edildiği fikrinin ortaya atılmasını sağlamıştır.

MMP'ler, nötral pH'da aktif olan, çinko içeren kalsiyum bağımlı proteolitik özellik taşıyan bir enzim ailesidir (Li ve ark., 2006). MMP'ler inaktif zimojen formunda sekrete edilirler, ekstrasellüler aralıkta proteolitik degradasyona uğrayarak aktive olurlar (Brummer ve ark., 2002). MMP'ler embriyogenez, hücre proliferasyonu ve motilitesi, remodelling, yara iyileşmesi ve anjiyogenez gibi süreçlerde önemli görevler üstlenir (Curry ve ark., 2003; Folgueras ve ark., 2004). MMP'lerin 26 değişik formu vardır ve bu formları kodlayan 24 değişik gen bölgesi tanımlanmıştır (Mishra ve ark., 2013). Substrat seçimleri, sekans benzerlikleri ve yapısal organizasyonlarına göre omurgalılarda MMP'ler; kollajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilisinler, membranöz MMP'ler ve diğer MMP'ler olmak üzere altı gruba ayrılabilir (Bkz. Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Matriks metalloproteinazları ailesi. John ve Tuszynski (2001)'den değiştirilerek alınmıştır.

İsim	Moleküler Ağırlık (kDa)		Substrat
	Latent Form	Aktif Form	
Kollajenazlar			
MMP-1 (intersitisyal kollajenaz)	55	45	Fibriler Kollajenler
MMP-8 (nötrofil kollajenaz)	75	58	Fibriler Kollajenler
MMP-13 (kollajenaz-3)	60	48	Fibriler Kollajenler
Jelatinazlar			
MMP-2 (Jelatinaz-A)	72	66	Tip I, IV, V ve diğer fibriler kollajenler, jelatin
MMP-9 (Jelatinaz-B)	92	86	Tip IV, V kollajen, jelatin
Stromelisinler			
MMP-3 (Stromelisin-1)	57	45	Laminin, fibronektin, non-fibriler kollajenler
MMP-10 (Stromelisin-2)	57	44	Laminin, fibronektin, non-fibriler kollajenler
MMP-11 (Stromelisin-3)	51	44	Laminin, fibronektin, non-fibriler kollajenler
Matrilisinler			
MMP-7 (Matrilisin -1)	28	19	Laminin, fibronektin, non-fibriler kollajenler
Membranöz MMP'ler			
MMP-14 (MT1-MMP)	66	60	Jelatinaz A, fibriler kollajenler, proteoglikanlar, ECM glikoproteinleri
MMP-15 (MT2-MMP)	68	62	Jelatinaz A
MMP-16 (MT3-MMP)	?	?	Jelatinaz A
MMP-17 (MT4-MMP)	?	?	?

Tüm MMP'lerin çeşitli ortak özellikleri vardır:

1. Benzer amino asit dizilimlerine sahiptirler.
2. İnaktif proenzim formunda salgılanırlar.
3. Aktivasyonları proteolitik bir süreç veya cıvalı bileşikler ile etkileşim sonucu gerçekleşir.
4. Aktif merkezlerinde bulunan çinko ve kalsiyum konformasyonlarını korumaları ve aktiviteleri için gereklidir.
5. Aktif enzimlerin tümü TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) tarafından inhibe edilir, nötral pH'da aktiflerdir.

Bazı MMP'ler (örneğin stromelisinler ve kollajenazlar) benzer substralara özelleşmiştir ancak doku ekspresyon düzeyleri değişkenlik gösterir. Aynı matriks bileşeninin farklı lokasyon ve aktivitedeki enzimler tarafından degrade ediliyor olması mekanizmanın hassas kontrolünü olanaklı kılar. Proteoglikanlar, konnektif dokuda hızlı bir turnover'e sahiptir. Tersine kollajenler daha nadiren yıkılır ve tekrar yapımı zordur. Bu nedenle konnektif doku turnover'i için hız kısıtlayıcı basamak kollajen yıkımı basamağıdır (Shingleton ve ark. 1996).

MMP-2 (jelatinaz-A, 72-kDa tip IV kollajenaz), Tip I, IV kollajen ve bazı non-kollajen ekstrasellüler matriks proteinlerini yıkar (Patterson ve ark., 2001). MMP-2, fibroblastlar, keratinositler, endotelial hücreler osteoblastlar ve monositler gibi birçok hücre tipi tarafından üretilebilir (Hashizume, 2007).

MMP-9 (jelatinaz-B, 92-kDa jelatinaz), Tip I kollajenin N-terminalinde bulunan peptid bağını yıkar. Asidik ortamda aktiftir. Ekstrasellüler matriksin kollajen bağımlı remodelling sürecinde rol oynamaktadır. MMP-9 alveolar makrofajlarda, polimorfonükleer lökositlerde, osteoklastlarda, keratinositlerde ve trofoblastlarda üretilir (Hashizume, 2007).

TIMP'ler (tissue inhibitors of MMPs), MMP'lerin endojen inhibitörleridir (Bkz Çizelge 1.2). TIMP'lerin dört adet alt tipi bulunmaktadır (TIMP-1, 2, 3 ve 4). TIMP'ler, MMP'lerin üzerindeki katalitik çinko bölümüne 1:1 oranında bağlanarak inhibisyona neden olurlar (21). TIMP'lerin, kardiyak fibrozis (25), anjiyogenez (26,27) ve apoptozis (28,29) gibi süreçlere etkide bulunduğu gösterilmiştir. Kalpte TIMP-4 artışı, MMP-9 aktivitesini baskılayarak matriks remodelling sürecinde önemli rol oynamaktadır (30).

MMP ve TIMP ekspresyonları arasındaki dengenin bozulması tümör invazyonu, romatoid artrit, ateroskleroz, anevrizmalar, nefritler, doku ülserleri, fibrozis ve endometriyozis gibi birçok patolojik durum ile ilişkilendirilmektedir (Jaoude ve Koh, 2016).

Çizelge 1.2. TIMP alt tipleri.

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
MMP inhibisyonu	Hepsini	Hepsini	Hepsini	Hepsini?
Lokalizasyonu	Diffüze olabilir	Diffüze olabilir	Ekstrasellüler matrikse bağlı	?
Ekspresyonu	İndüklenebilir	Sürekli	İndüklenebilir	?
Doku dağılımı	Kemik, over	Akciğer, over, beyin, testis, kalp, plasenta	Böbrek, beyin, akciğer, kalp, over	Böbrek, plasenta, kolon, testis, beyin, kalp, over, iskelet kası

1.5. Amaç ve Hipotez

Diyabetli hastalar yüksek kardiyovasküler komplikasyon riski taşımaktadırlar. Kardiyovasküler komplikasyonlar diyabette önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. (Haffner ve ark., 1998). Diyabetik kardiyomiyopati (DKMP) diyabetin neden olduğu kalp damar bozukluklarından bağımsız bir patolojidir. Diyabetik kardiyomiyopati diyabet hastalığının miyokarda “hücresele düzeyde yaptığı direkt saldırı” olarak nitelendirilmekte ve ayrı bir hastalık olarak kabul edilmektedir (Murarka ve Mohaved, 2010). İlk kez Rubler ve ark. (1972), tarafından tanımlanan DKMP, diyabet hastalarında koroner arter hastalığı ve hipertansiyondan bağımsız olarak gelişen ventriküler disfonksiyon olarak ifade edilmektedir (Rubler ve ark., 1972).

Diyabetik kardiyomiyopatide yapısal olarak sol ventrikülde konsentrik hipertrofi ve sol ventrikül duvar sertliğinde artış görülür. Sol ventrikül diyastolik disfonksiyonu en erken, en karakteristik ve çoğu zaman da tek bulgudur (Astorri ve ark., 1997). Diyabetik kalp biyopsilerinde görülen temel patolojik değişimler intersitisyel fibrozis, miyosit hipertrofisi ve artmış kontraktıl protein glikozilasyonudur. Diyabetik kardiyomiyopati kompleks bir patofizyolojiye sahiptir. Hastalığın oluşumu ve gelişiminin temel nedeni glukoz metabolizmasındaki bozulma sonucu oluşan hiperglisemidir. Reaktif oksijen türevlerinde ve ileri glikozilasyon ürünlerindeki artış, renin-anjiyotensin-aldosteron sistemindeki değişimler, bakır metabolizmasının bozulması, kardiyak otonomik nöropati, HIF-1 (hipoksi ile indüklenen faktör-1) ve

VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) sinyal aksında meydana gelen değişimler ile diyabetik vaskülopati ve mikroanjyopati diyabetik kardiyomiyopatinin oluşumuna sinerjik olarak etkiye bulunur (Hayat ve ark., 2004).

Diyabetik kardiyomiyopati deney hayvanlarında da oluşturulabilmektedir. Pankreas beta hücreleri için toksik olan streptozotosin (STZ) ile deneysel olarak Tip I diyabet oluşturulan sıçanlarda diyabetik kardiyomiyopati gelişmektedir (Joffe ve ark., 1999; Hoit ve ark., 1999; Trost ve ark., 2002). Diyabet oluşumunu takiben, 5. haftada bazal kontraktıl disfonksiyonun başladığı, 6. haftadan itibaren diyabetik kardiyomiyopatinin tamamen geliştiği gösterilmiştir (Hoit ve ark., 1999).

Dünyada yaklaşık 140 milyon kişi yüksek irtifa (deniz seviyesinden 2500 m ve yukarısı) koşullarında yaşamaktadır. Yüksek irtifada yaşamın ve hipoksiye maruziyetin kardiyoprotektif olduğu çeşitli çalışmalarla belgelenmiştir. Hipoksinin koruyucu etkisini sınamak adına literatürde çeşitli şiddet ve sürede farklı birçok hipoksi protokolü kullanıldığı görülmektedir. Dong ve ark. (2003), 42 gün boyunca, 5000 metreye denk gelen, günde 6 saatlik hipobarik hipoksi uyguladıkları sıçanlarda, 30 dakikalık iskemi/reperfüzyon protokolü sonrasında aralıklı hipoksi grubundaki toparlanma yanıtının kontrole göre önemli derecede güçlü olduğunu bildirmişlerdir (Dong ve ark., 2003). Ding ve ark. (2005), kaç gün günde 6 saat, 5000 metrelik yüksekliğe denk aralıklı hipoksi uyguladıkları sıçanlarla yaptıkları çalışmada, aralıklı hipoksi uygulamasının iskemi/reperfüzyon hasarını azalttığını, postiskemik sol ventrikül performansını geliştirdiğini göstermişlerdir (Ding ve ark., 2005). Özetle, literatürdeki genel kanı aralıklı hipoksinin iskemi/reperfüzyon hasarını azalttığı ve kardiyak fonksiyonlarda iyileşmeye yol açtığı yönündedir.

Hipoksinin hücre içi etkilerinin ortaya çıkışında HIF (Hipoksi ile İndüklenen Faktör) molekülünün başat bir role sahip olduğu bilinmektedir. Tüm hücrelerde bulunan HIF molekülünün HIF-1, HIF-2 ve HIF-3 olarak adlandırılan izoformları bulunmaktadır. Heterodimer yapısında bir transkripsiyon faktörü olan HIF-1 molekülünün α ve β olmak üzere iki alt birimi tanımlanmıştır. HIF-1 β , hücrede hipoksiden bağımsız ve yoğun olarak eksprese edilirken, HIF-1 α oksijen varlığında prolin-4 hidroksilaz

domain (PHD) enzimi tarafından hızla degrade edilir. Hipoksik koşullarda oksijeni bir kofaktör olarak kullanan PHD enzimi inaktif hale gelir ve degradasyondan kurtulan HIF-1 α β alt birimi ile birleşerek HIF-1 molekülünü oluşturur. Bu olaya “HIF stabilizasyonu” adı verilir. Stabilize olan HIF-1 molekülü genomda bulunan HRE (hypoxia response element) bölgeleri üzerinde etkili olarak hücredeki birçok proteinin transkripsiyonunu modifiye eder (Rabinowitz, 2013). HIF molekülünü oksijen varlığında degrade eden PHD enzimlerinin üç izoformu (PHD1, PHD2 ve PHD3) bulunmaktadır (Greijer ve ark., 2005). Kalpte her üç PHD izoformu da bulunmakla birlikte PHD2 ve PHD3’ün ekspresyonu daha yoğundur (Rocha S, 2007).

Damarlanma (anjyogenez) embriyodan yetişkine uzanan gelişim sürecinde kritik bir öneme sahip olduğu gibi yetişkin bireyde dokunun oksijen ihtiyacının karşılanması ve yara iyileşmesi gibi süreçlerde de rol almaktadır. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) anjyogenezin ana kontrolörüdür. VEGF arterleri, venleri ve lenfatikleri oluşturan mikro ve makroanjyogenik hücreleri etkileyen potent bir mitojendir (Neufeld ve ark., 1999). Ek olarak VEGF, yeni damar oluşumundaki ilk aşama olan “tomurcuklanma” aşamasında uyarıcı görevi görmekte, anjyogenez için kritik bir adım olan vasküler permeabilitenin arttırılmasında görev almaktadır (Ferrara ve ark., 2003). Çeşitli hücre içi ve hücre dışı faktörlerden etkilenen VEGF gen ekspresyonunun temel düzenleyicisi oksijen konsantrasyonudur. HIF’in alt hedefi olan VEGF’nin hipoksik durumda transkripsiyonunun arttığı bilinmektedir. HIF-VEGF sinyal aksı doku oksijen ihtiyacına yönelik anjyogenezin regülasyonu açısından fizyolojik bir öneme sahiptir.

HIF molekülünün diğer bir alt hedefi olan matriks metalloproteinazları (MMPs) ekstrasellüler matriks degradasyonunda kritik rol üstlenen çinko bağımlı endopeptidazlardır. Önemli bir ekstrasellüler matriks bileşeni olan kollajenler dahil olmak üzere birçok ekstrasellüler matriks proteinini yıkan MMP’ler, TIMPs (Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases) adı verilen inhibitör proteinler tarafından sıkı kontrol altında tutulmaktadır. MMP/TIMP dengesi ekstrasellüler matriksin

yapım/yıkım dengesini belirlerken, bu dengenin bozulması hipertansif kalp yetmezliği ve kardiyak hipertrofi gibi birçok patolojiye neden olmaktadır.

Diyabetik hastalarda vasküler patolojilerin sık görüldüğü ve miyokardiyal iskemiye karşı gelişen anjiyogenik yanıtın bozulduğu bilinmektedir (Abaci ve ark., 1999). Bu bozulmanın en önemli nedeninin, HIF ekspresyonunun azalması ve/veya hipoksi ile indüklenen HIF cevabındaki bozulma olduğu kabul edilmektedir (Heather ve Clarke, 2011). HIF'in önemli bir alt hedefi olan VEGF, HIF cevabı ile damarlanma arasındaki ilişkiyi kuran temel moleküldür. Diyabetik ratlarda yapılan deneysel çalışmalarda kardiyak VEGF mRNA ve proteinin diyabetiklerde düşüş gösterdiği ve buna bağlı olarak kalpte kapiller yoğunluğun azaldığı saptanmıştır (Thangarajah ve ark., 2009). HIF sinyalizasyonunda meydana gelen bozulma diyabete bağlı oksidatif stres artışı ile de ilişkilendirilmektedir (Palmer ve Clegg, 2014).

DKMP'de miyokardiyal kollajen tip I, III ve VI'nın kalp dokusunda biriktiği ve intersitisyel ve perivasküler fibrozise yol açtığı, bu birikimin sol ventrikül sistolik ve diyastolik fonksiyon bozuklukları ile korelasyon gösterdiği bildirilmektedir (Hua ve Nair, 2015). DKMP'de görülen fibrozisin diyabetik kalpte MMP ekspresyon/aktivitesinde meydana gelen azalma ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir (Mishra ve ark., 2013). Bu azalma, HIF sinyalizasyonunda meydana gelen bozulmaya ek olarak diyabete bağlı oksidatif stres artışı ile de ilişkili görünmektedir (Uemura ve ark., 2001).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türevlerinin (ROS) hücrede artışı ve hücrenin antioksidan savunma sistemlerinin kapasitesinin aşılması ile gerçekleşen bir hücresel hasarlanma türüdür. ROS hücrede protein, lipit, DNA ve membrana bağlı çoklu doymamış yağ asitleri gibi birçok yaşamsal makromolekülde hasara yol açar (Giacco ve Brownlee, 2010). Diyabetle birlikte gelişen hiperglisemi ROS üretimini ve ileri glikozilasyon ürünleri (AGEs) nin oluşumunu artırır. AGEs, kollajen lifler arasında çapraz köprüler oluşturarak miyokardiyal sertliğe ve fibroze neden olur (Osawa ve Kato, 2005). ROS artışının yol açtığı hücre ölümü, anormal kardiyak remodelling'e sebep olarak diyabetik kardiyomiyopatide görülen karakteristik fonksiyonel ve

morfolojik anomalilere sebep olur (Miki ve ark., 2013). Öte yandan diyabette gelişen oksidatif stres hücre içi kalsiyum homeostazisini etkileyerek kontraktilitede ve HIF-PHD-VEGF yolağı üzerinden damarlanmada bozulmaya neden olur, MMP'lerin aktivasyonunu etkileyerek fibrozis gelişimini hızlandırır.

Sonuç olarak; aralıklı hipoksinin HIF aracılı kardiyoprotektif etkisi ile ilgili çalışmalar dikkate alındığında, aralıklı hipoksi uygulamasının diyabetik kalpte HIF-VEGF sinyal yolağını ve damarlanma artışını indükleyerek ve MMP aktivasyonunu düzenleyerek kalbin mekanik fonksiyonunda iyileşmeye yol açabileceğini öngörmek akla uygundur. Bu nedenle çalışmamızda kronik aralıklı hipoksi uygulamasının diyabetik kalpte kontraktıl performans; PHD, VEGF ve MMP protein düzeyleri; damarlanma ve redoks statusu üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Fonksiyonda beklenen olası iyileşmenin altında yatan mekanizmanın incelenen protein düzeyleri, damarlanma ve oksidan-antioksidan dengede meydana gelmesi beklenen değişiklikler ile ilişkili olabileceğinin literatür bilgisi ışığında tartışılması planlanmıştır.

Dolayısıyla **ana hipotezimiz**, 42 gün süreli aralıklı hipoksi uygulamasının diyabetik kalp fonksiyonları üzerinde iyileştirici etki göstereceği yönündedir. Bu olası iyileştirici etkiye dair mekanizmanın açıklanmasına yönelik olarak kalp dokusu örneklerinde aşağıdaki moleküler ve histolojik incelemelerin yapılması planlanmıştır:

- 1) HIF hedef proteinleri arasında yer alan ve anjiyogenezin major düzenleyici molekülü olan VEGF protein seviyeleri
- 2) Kapiller yoğunluk
- 3) HIF sinyal yolağının regülatörü olan PHD2 ve PHD3 protein düzeyleri
- 4) Kardiyak fibroziste önemli role sahip olan MMP-2 ve MMP-9 protein düzeyleri
- 5) Redoks statusu

Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun raporuna göre dünyada her 11 yetişkinden birisi diyabetlidir ve diyabet ve diyabete bağlı hastalıklar dünya sağlık harcamalarının %12'sini oluşturmaktadır. (IDF, 2015). Diyabetin en sık görülen

komplasyonlarından biri olan diyabetik kardiyomiyopati toplum sağlığı açısından büyük bir önem arz etmektedir. Diyabetik kardiyomiyopatiye karşı koruyucu ve/veya tedavi edici yöntemlerin geliştirilmesi hastaların yaşam kalitesini olumlu yönde etkileyecektir. Aralıklı hipoksinin, STZ ile indüklenen tip I diyabetli ratlarda gelişen diyabetik kardiyomiyopatiye karşı koruyucu etkisinin olup olmadığının araştırılması DKMP patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması için önemlidir.

Literatürde, diyabetik kardiyomiyopati veya aralıklı hipoksi uygulamasının kardiyoprotektif etkileri ile ilgili çok sayıda yayına rastlamak mümkündür. Ancak diyabetik kardiyomiyopatideki fonksiyon bozukluğuna karşı aralıklı hipoksinin koruyucu etki göstereceği iddiasını ortaya koyan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Araştırmamız, bu yönüyle literatüre yeni ve zgn bulgu katabilme potansiyeli taşımaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda kullanılan Wistar albino (*Rattus norvegicus*) cinsi sıçanlar Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Eğitim ve Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi. Laboratuvarımıza getirilen deney hayvanları bir haftalık adaptasyon sürecinin ardından deneylere dahil edildi. Hayvanlar 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü, 22 °C sıcaklık %50 bağıl neme sahip olan özel bir odada muhafaza edildi. Hayvanlar standart sıçan pelet yemi ile *ad libitum* olarak beslendi, içme suyu olarak *ad libitum* musluk suyu verildi.

Çalışmamızda kullanılan hayvanlar için Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan izin alındı (Ek 1).

2.1.1. Fonksiyonel Çalışmalarda Kullanılan Hayvanlar

Sol ventrikül fonksiyonu ölçümü için alınan 64 adet 10 haftalık Wistar albino (*Rattus norvegicus*) cinsi erkek sıçan daha önce Anabilim Dalımız laboratuvarlarında yapılan çalışmalardaki mortalite oranları baz alınarak dört gruba, farklı sayılarda, rastgele dağıtıldı:

1. Kontrol (n=13) (K)
2. Kontrol + Aralıklı Hipoksi Uygulaması (n=16) (AH)
3. Diyabet (n=16) (DM)
4. Diyabet + Aralıklı Hipoksi Uygulaması (n=19) (DM+AH)

Deneyler sonunda her gruptan on tane (n=10) hayvandan analiz edilebilecek fonksiyon verisi alındı.

2.1.2. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Hayvanlar

Moleküler çalışmalar için, alınan 39 adet 10 haftalık Wistar albino (*Rattus norvegicus*) cinsi erkek sıçanlar rastgele dört gruba ayrıldı:

1. Kontrol (n=10) (K)
2. Kontrol + Aralıklı Hipoksi Uygulaması (n=10) (AH)
3. Diyabet (n=9) (DM)
4. Diyabet + Aralıklı Hipoksi Uygulaması (n=10) (DM+AH)

Deneyler sonunda, diyabet grubunda dokuz (n=9) diğer gruplarda onar tane (n=10) hayvandan doku elde edildi.

2.2. Deneysel Tip I Diyabet Oluşturulması

Laboratuvara adaptasyon periyodunun ardından deneysel Tip I diyabet oluşturmak için 11 haftalık hayvanlara tek doz (50 mg/kg) Streptozotosin (STZ) intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi. Bir hafta sonra (12. hafta) kan glukoz düzeyleri ölçülerek 300 mg/dL ve üzeri değerlere sahip sıçanlar diyabetli kabul edilerek çalışmaya alındı.

2.3. Hipoksi Protokolü

12.haftadan itibaren hipoksi uygulamasına tabi tutulacak gruplar (AH ve DM+AH grupları) hipobarik hipoksik kamarada 42 gün boyunca, günde 6 saat, 3000 metreye denk, 69,3 kPa'lık (520 mmHg, $\approx$ %14 O₂) basınçta tutuldular. Kontrol ve diyabet gruplarındaki sıçanlar aynı süre kafeslerinde bekletildi.

2.4. Hayvanların Sakrifikasyonu

42 günlük deney protokolünün sonunda fonksiyonel ve moleküler incelemelerde kullanılacak dokuları elde etmek üzere; hayvanlar terminal kan şekeri ölçümünün ardından, heparinli sodyum tiyopental (50 mg/kg) ile anestezi edildi. Ağrılı uyarana yanıt vermedikleri anlaşıldıktan sonra sonra göğüs kafesleri açılarak, kalpleri hızlı bir şekilde çıkartıldı. Fonksiyon çalışması yapılacak kalpler Langendorff düzeneğine asıldı. Moleküler incelemelerde kullanılacak kalplerde sol ventrikül ayrılarak sıvı azot içerisinde donduruldu ve bir eppendorf tüpüne konularak -80 °C’de saklandı. Toraksa dolan kan kırmızı kapaklı biyokimya tüpüne alınarak santrifüj edildi. Elde edilen serum oksidan status ölçümlerinde kullanılmak üzere -80 °C’de saklandı.

2.5. Langendorff Yöntemi ile Kalp Fonksiyonlarının Ölçülmesi

42 günlük deney periyodunun ardından kuyruktan terminal kan şekeri ölçümü yapılan hayvanlar, heparinli sodyum tiyopental ile (50 mg/kg) anestezi edildi. Ağrılı uyarana yanıt vermedikleri anlaşıldıktan sonra sonra göğüs kafesleri açılarak, kalpleri hızlı bir şekilde çıkartılıp, önceden karbojen ile gazlanmış (%95 O₂ ve % 5 CO₂), soğuk ve düşük Ca²⁺ içeren modifiye Krebs-Henseleit çözeltisi (mM: 119 NaCl, 4,8 KCl, 1,8 CaCl₂, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 20 NaHCO₃, ve 10 Glukoz, ve pH 7.4) içine alındı. Bu çözeltinin içerisindeyken kalp ağırlığı tartıldı.

Kalpler Langendorff sistemine, bir kanül yardımıyla, aorttan takıldı. Dokunun canlılığını koruması için, kanülden belirli bir hızda akan, sürekli karbojen ile gazlandırılan ve sıcaklığı 37°C’de tutulan modifiye Krebs-Henseleit çözeltisi ile kalbe sürekli retroperfüzyon yapıldı. Sağ ve sol atriyum cerrahi makas yardımıyla kesilerek uzaklaştırıldı. Hemen ardından bir pens yardımıyla atriyoventriküler (AV) düğümün bulunduğu interventriküler septum bölgesi sıkıştırılarak AV düğümü lezyona uğratıldı. İşlemin başarısı kalp frekansında meydana gelen dramatik azalma ile teyit edildi. İçi su dolu elastik bir balon kalbin sol ventrikülüne yerleştirildi. Balonun iç basıncı veya diyastolik basınç $\approx$ 10 mmHg olacak şekilde ayarlandı.

Bu işlemlerin ardından kalbin stabilizasyonu için 30 dakika beklendi. 30 dakikalık stabilizasyon periyodunun ardından, sabit hızda atım için; kanüle ve kalbin apeks bölgesine bağlanan elektrotlar yardımıyla kalbe 24 mV genlikte, 5 Hz frekansta (300 atım/dakika) sürekli uyarı verildi. Sol ventrikül basınç gelişimi (LVDP) ve aorta basıncı bir analog-dijital sistem yardımı (MP 35, Biopac System) ile online olarak bilgisayara kaydedildi. Basınç gelişim hızı (kasılma, +dP/dt), basınç bozulum hızı (gevşeme, -dP/dt) LVDP değerinin üzerinde yapılan işlemler ile hesaplandı.

Bazal fonksiyonel ölçümlerin ardından kalp dokularına β reseptör agonisti olan isoproterenol (ISO) uygulanarak inotropik rezerv ölçümü yapıldı. En düşük doz olan 10^{-10} mol/L dozundan başlayarak sırasıyla 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} ve 10^{-5} mol/L dozları uygulandı. Uygulanan ilacın yıkanması için dozlar arasında sırasıyla 10, 15, 20 ve 30ar dakika beklendi. Agonist uygulamasını takiben alınan maksimal LVDP yanıtlarıyla oluşturulan doz-yanıt eğrisi gruplar arasında karşılaştırıldı.

Langendorff yönteminin ardından sol ventrikül lateral duvarının, apekten basise doğru ikinci 1/3'lük bölümü histolojik incelemeler için tamponlu formaldehit içerisine alınarak Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalına gönderildi.

2.6. Western Blot Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini

Doku örneklerinden yaklaşık 150 mg'lık bir parça sıvı azot içerisinde havan ve tokmak yardımıyla ufalandı. Ufalanmış örneklerin üzerine 800 ml homojenizasyon tamponu eklendi. Homojenizatör (Glas-Col Variable Speed, Reversible Homogenizer) yardımıyla ezilen dokular, 10.000 rpm, +4 °C'de 10 dakika santrifüj (Hettich Zentrifugen Mikro 200R) edildi. Pelet atıldı, süpernatant kullanılmak üzere saklandı.

Örneklerin toplam protein konsantrasyonları Bradford yöntemi kullanılarak ölçüldü. Yükleme aşaması için her örnekten 40 μ g protein alındı, Laemmli Sample Buffer ile

1:1 oranında karıştırıldıktan sonra 7 dakika boyunca kaynatıldı. Kaynatmanın ardından yüklemeye hazır hale gelen örnekler sodyum dodesil sültat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) işlemi için poliakrilamid jele sırasıyla yerleştirildi. 150 Voltluk sabit gerilimde 2 saat boyunca yürütülen proteinler, PVDF membrana 400 miliamperlik sabit akım ile 1,5 saatte transfer edildi. Transfer aşamasının ardından hedefe spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin kapatılması için membran %3'lük BSA çözeltisinde 1 saat boyunca bloklama işlemine tabii tutuldu.

Bloklamanın ardından membran +4 °C'de bir gece boyunca (≈12-16 saat) primer antikorun (anti-PHD2, anti-PHD3, anti-VEGF, anti-MMP2, anti- MMP9) içerisinde bulunduğu %3'lük BSA çözeltisinde inkübe edildi. İdeal primer antikor konsantrasyonu yapılan ön denemeler ile tespit edildi. Primer antikor ile inkübasyon aşamasının ardından, ortamda bulunan spesifik bölgeye bağlanmamış primer antikorları uzaklaştırmak için, membran yıkama solüsyonunun (TBST solüsyonu) içerisine konularak hafif devirde çalışan sallayıcıda oda sıcaklığında, 10 dakika boyunca yıkandı. Bu işlem üç kere tekrarlandı. Yıkamanın ardından membran oda sıcaklığında 1 saat boyunca sekonder antikorun içerisinde bulunduğu %3'lük BSA çözeltisinde inkübe edildi. Yukarıda anlatılan yıkama aşamaları tekrarlandı.

Yıkamanın tamamlanmasının ardından, sekonder antikorlara kenetli HRP (*Horseradish peroxidase*) enziminin substratını içeren elektrokemilüminisans özellikli madde membranın üzerine döküldü. Antikorların bağlandığı bölgelerin ışık vermesini sağlayan bu maddenin dökülmesinin ardından membran bir fotoğraf filmi ile aynı kasette bekletildi. Banyo işleminden sonra fotoğraf filmine fikse olan görüntü tarayıcı vasıtasıyla dijital hale getirildi. ImageJ 1.46R analiz programı kullanılarak bant yoğunlukları analiz edildi.

2.7. Total Oksidan Status (TOS) ve Total Antioksidan Status (TAS) Ölçümleri

TOS ve TAS ölçümleri hem serumda hem de kalp dokusunda ayrı ayrı yapıldı. Serum örnekleri herhangi bir ön işleminden geçmeden ölçüme alınırken doku örnekleri

homojenize edildi. Ölçümlerde kitin (Rel Assay Diagnostics) içerisindeki kitin kılavuz esas alındı.

Homojenizasyon için 140 mmol derişimde, asiditesi pH=7,4 olan KCl çözeltisi tampon olarak kullanıldı. Homojenize edilecek doku tartıldı, 1 gram dokuya 9 mililitre çözelti olacak şekilde homojenizasyon tamponu eklendi. Homojenizatör yardımı ile ezilen doku 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Pelet atıldı, süpernatant serum gibi analiz edildi.

2.7.1. TAS Ölçümü

Örneklerin (doku ve serum) ölçümüne geçilmeden önce, kitin içerisindeki kitin içeriğindeki antioksidan madde derişimi belli standartın antioksidan düzeyi ölçüldü. Gerek görülmesi halinde standart ölçümü belirli aralıklarla tekrarlandı. Kitin düzgün çalışıp çalışmadığını anlamak amacıyla, sadece ilk kullanımda, kitin içerisindeki kitin içeriğindeki antioksidan madde derişimi belli olan QC 1 ve QC 2 maddelerinin antioksidan düzeyleri ölçüldü istenilen aralıklarda olup olmadıkları saptandı.

Örneklerin antioksidan düzeylerinin ölçümü için 30 µl örnek 500 µl Reaktif 1 (R1) ile karıştırıldı. 30 saniye sonra 660 nm dalga boyunda birinci absorbands değeri (A1) ölçüldü. Ölçümü takiben bu karışıma 75 µl Reaktif 2 (R2) eklendi, iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika boyunca 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 660 nm dalga boyunda ikinci absorbands değeri (A2) ölçüldü.

Antioksidan status aşağıdaki formül kullanılarak mmol/L cinsinden hesaplandı:

$$\Delta\text{Abs Örnek veya Standart} = A2-A1$$

$$\text{Sonuç} = \frac{[(\Delta\text{Abs H}_2\text{O}) - (\Delta\text{Abs Örnek})]}{[(\Delta\text{Abs H}_2\text{O}) - (\Delta\text{Abs Standart})]}$$

2.7.2. TOS Ölçümü

Örneklerin (doku ve serum) ölçümüne geçilmeden önce, kitin içerisinden çıkan, içeriğindeki oksidan madde derişimi belli standartın oksidan düzeyi ölçüldü. Gerek görülmesi halinde standart ölçümü belirli aralıklarla tekrarlandı. Kitin düzgün çalışıp çalışmadığını anlamak amacıyla, sadece ilk kullanımda, kitin içerisinden çıkan, içeriğindeki oksidan madde derişimi belli olan QC 1 ve QC 2 maddelerinin oksidan düzeyleri ölçüldü istenilen aralıklarda olup olmadıkları saptandı.

Örneklerin oksidan düzeylerinin ölçümü için 75 µl örnek 500 µl Reaktif 1 (R1) ile karıştırıldı. 30 saniye sonra 530 nm dalga boyunda birinci absorbens değeri (A1) ölçüldü. Ölçümü takiben bu karışıma 25 µl Reaktif 2 (R2) eklendi, iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika boyunca 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 530 nm dalga boyunda ikinci absorbens değeri (A2) ölçüldü.

Oksidan status aşağıdaki formül kullanılarak µmol/L cinsinden hesaplandı:

$$\Delta\text{Abs Örnek veya Standart} = A2 - A1$$

$$\text{Standart Konsantrasyonu} = 10 \mu\text{mol/L}$$

$$\text{Sonuç} = \frac{(\Delta\text{Abs Örnek})}{(\Delta\text{Abs Standart})} \times \text{Standart Konsantrasyonu}$$

2.7.3. Oksidatif Stres İndeksinin (OSİ) Hesaplanması

Her denek için ölçülen TOS değeri TAS değerine bölünerek OSİ, ilgili denek için OSİ değeri elde edildi. OSİ değerleri gruplar arasında karşılaştırıldı.

2.8. Kapiller Yoğunluğun İncelenmesi

Histolojik inceleme için kalbin apeksinden alınan dokular tespit amacıyla 7-10 gün tamponlanmış %10’luk formalin içerisinde bekletildi. Fikse olan dokular rutin histolojik takip aşamalarına alındı; öncelikle su altında yıkanarak artan derecelerde alkol serilerinde bekletilerek dehidrate edildi. Bu işlemten sonra dokular şeffaflaşana

kadar ksilolde bekletildi. 4 saat 60 OC'de etüvde sıvı parafin infiltrasyonunu takiben dokular sert parafin bloklara gömüldü. Leica RM 2125RT model sliding mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Rutin takip işlemlerinden sonra sert parafin bloklara gömülen kalp dokularından poli-lizin kaplı lamalar üstüne 5 µm kalınlığında alınan kesitler gece boyunca 60°C'lik etüvde deparafinize edildi. Dereceli alkollerden geçirilerek dehidrate edilen kesitlerde sitrat tampon içerisinde mikrodalga fırında antijen açığa çıkarıldı. Peroksidaz enzim aktivitesini inhibe etmek için hidrojen peroksit ile muamele edildi. Non spesifik boyamaları engellemek için bloking solüsyonunda beklettikten sonra anti caveolin-1 antikorunda 37°C de 1 saat bekletildi (rabbit poliklonal, 1/250 dilüsyon, 3238S, Cell signaling). Fosfat tampon solüsyonu ile yıkandıktan sonra sekonder antikor uygulandı (Histostain plus kit, kat no: 858943). HRP (horse radish perodksidaz) uygulamasından sonra kromojen (DAB-diamino benzidin) uygulanarak antikorun görünür hale getirilmesi sağlandı. Çekirdek boyaması için hematoksilin kullanıldı. Preparatlar entellan ile kapatılarak mikroskop altında incelendi. Her gruptan 6 kesitte 3 alan 40X büyütmede incelenerek anti-caveolin 1 ile boyanan hücreler sayıldı.

2.9. İstatistiksel Analiz

Araştırma verilerinin istatistiksel analizi için Statical Package for Social Sciences (SPSS) sürüm 15 kullanıldı.

Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi kullanılarak belirlendi. Verilerin normal dağılım göstermesi, denek sayılarının yeterli olması ve verilerin ölçüm ile elde edilen nicel veriler olması nedeniyle parametrik testler tercih edildi.

Araştırmamızda K, AH, DM ve DM+AH grupları bağımsız nicel veriler içerdiğinden, One-Way ANOVA yöntemi ile çoklu karşılaştırmaya tabi tutuldu. Fark bulunması halinde Post-Hoc testi olarak kullanılan Tukey testi yardımıyla farkın hangi gruplar arasında olduğu tespit edildi.

Tüm istatistiksel analizler için anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edildi.



3. BULGULAR

Çalışmamızda diyabetik ratlara kardiyoproteksiyon amacıyla uygulanan kronik aralıklı hipoksinin, kalp fonksiyonları ile birlikte kalpte VEGF, PHD2, PHD3, MMP-2, MMP-9 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri ile miyokardiyal damar yoğunluğu ve oksidan-antioksidan denge (serum ve miyokardiyal) üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonuçları aşağıda farklı başlıklar altında sunulmuştur:

3.1. Fonksiyon Çalışması İçin Kullanılan Hayvanların Takip Değerleri

Langendorff çalışması için alınan hayvanların, başlangıç ve terminal vücut ağırlıkları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Başlangıç vücut ağırlığı değerlerinin homojen olması hedeflenmiş ise de yapılan Post-Hoc analizde AH ($166,70 \pm 16,34$) ve DM ($223,30 \pm 53,57$) grupları arasında önemli bir fark olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). Bu durumda deney gruplarına ait terminal ağırlıkların karşılaştırılması yerine, 42 günlük deney protokolü süresince hayvanların vücut ağırlıklarında meydana gelen değişim yüzdelерinin karşılaştırılmasının daha uygun olacağı düşünülmüştür.

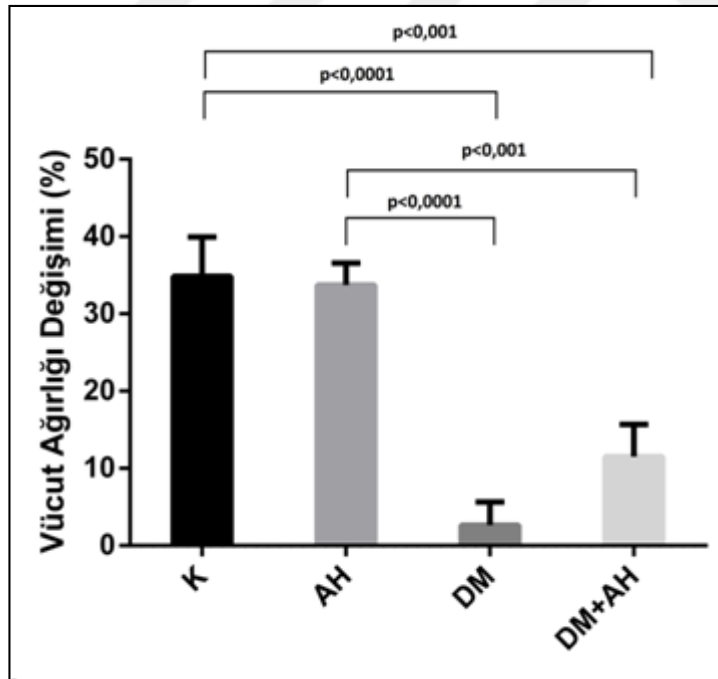
Çizelge 3.1. Fonksiyon çalışmasında kullanılan hayvanların başlangıç (Baş.) ve terminal vücut ağırlıkları (Son) (g)

	K		AH		DM		DM+AH	
	Baş.	Son	Baş.	Son	Baş.	Son	Baş.	Son
1	179	240	146	196	214	226	278	271
2	188	249	176	240	-	169	213	240
3	218	223	196	-	176	285	242	275
4	158	234	176	230	272	269	230	256
5	270	343	175	214	293	270	164	205
6	165	239	167	225	241	226	162	188
7	163	235	160	214	273	312	198	222
8	-	171	173	265	265	266	239	253
9	182	232	158	204	203	205	194	-
10	160	245	140	181	149	227	198	161
	187,00	241,10	166,70	218,78	231,78	245,50	211,80	230,11
ORT $\pm$ SS	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	36,35	42,00	16,34	24,90	49,20	42,36	36,25	39,09

Hayvanların % vücut ağırlığı değişimi değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasında fark tespit edilmiştir ($p<0,01$). Post-Hoc analiz bu farkın, K ($34,84 \pm 15,32$) ve DM ($2,63 \pm 8,51$); K ($34,84 \pm 15,32$) ve DM+AH ($8,38 \pm 12,56$); AH ($33,74 \pm 8,42$) ve DM ($2,63 \pm 8,51$); AH ($33,74 \pm 8,42$) ve DM+AH ($8,38 \pm 12,56$) grupları arasında olduğu göstermektedir (Çizelge 3.2 Şekil 3.1).

Çizelge 3.2. Fonksiyon çalışmasında kullanılan hayvanların vücut ağırlığı değişimi (%)

	K	AH	DM	DM+AH
1	34,08	34,25	5,61	-2,52
2	32,45	36,36	14,97	12,68
3	2,29	-	-	13,64
4	48,10	30,68	-1,10	11,30
5	27,04	22,29	-7,85	25,00
6	44,85	34,73	-6,22	16,05
7	44,17	33,75	14,29	12,12
8	-	53,18	0,38	5,86
9	27,47	29,11	0,99	-
10	53,13	29,29	-	-
ORT $\pm$ SS	$34,84 \pm 15,32$	$33,74 \pm 8,42$	$2,63 \pm 8,51$	$11,77 \pm 7,90$



Şekil 3.1. Fonksiyon çalışması için kullanılan hayvanların, deney protokolü süresince vücut ağırlıklarında meydana gelen değişim (%)

Hayvanların ıslak kalp ağırlığının (KA) terminal vücut ağırlığına (VA) oranlanması ile elde edilen KA/VA oranları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Çizelge 3.3).

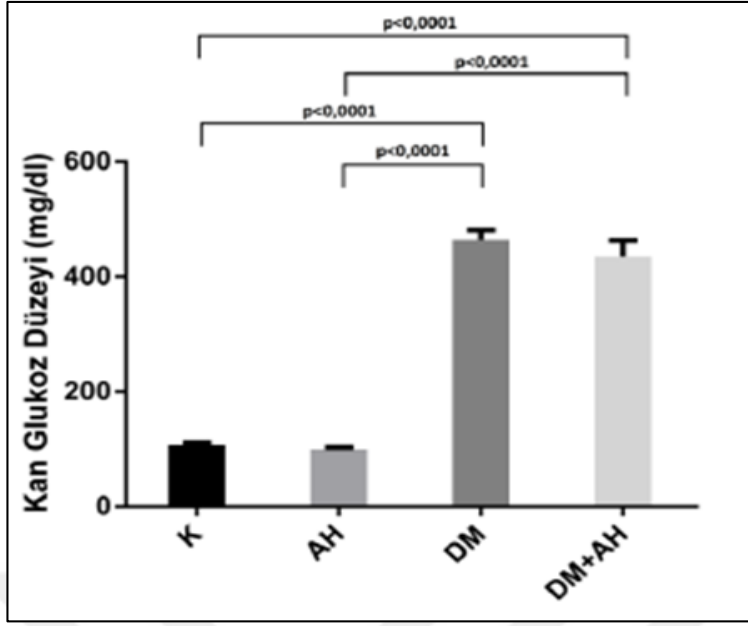
Çizelge 3.3. Hayvanların ıslak kalp ağırlıkları (KA) (g), terminal vücut ağırlıkları (VA) (g) ve KA/VA oranları ($\times 10^3$)

	K			AH			DM			DM+AH		
	KA	VA	KA/VA	KA	VA	KA/VA	KA	VA	KA/VA	KA	VA	KA/VA
1	1,03	240	4,29	1,01	196	5,15	0,95	226	4,20	1,38	271	5,09
2	1,21	249	4,86	-	240	-	0,89	169	5,27	1,02	240	4,25
3	0,92	223	4,13	-	-	-	1,31	285	4,60	-	275	-
4	1,11	234	4,74	1,05	230	4,57	1,33	269	4,94	1,13	256	4,41
5	1,31	343	3,82	0,93	214	4,35	1,42	270	5,26	0,94	205	4,59
6	1,03	239	4,31	1,12	225	4,98	1,22	226	5,40	0,89	188	4,73
7	1,12	235	4,77	1,11	214	5,19	1,36	312	4,36	1,07	222	4,82
8	0,77	171	4,50	1,24	265	4,68	1,25	266	4,70	1,53	253	6,05
9	1,04	232	4,48	0,96	204	4,71	0,83	205	4,05	-	-	-
10	1,06	245	4,33	0,81	181	4,48	1,10	227	4,85	0,86	161	5,34
Ort	1,06	241,10	4,42	1,03	218,78	4,76	1,17	245,50	4,76	1,10	230,11	4,91
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SS	0,15	42,00	0,32	0,13	24,90	0,31	0,21	42,36	0,47	0,24	39,09	0,58

Fonksiyon çalışmasına dahil edilen hayvanların, terminal (sacrifikasyon öncesi) kan glukoz düzeyleri gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli fark göstermektedir ($p<0,001$). Post-Hoc analiz bu farkın K ve DM; K ve DM+AH; AH ve DM; AH ve DM+AH grupları arasında olduğunu ortaya koymaktadır (Çizelge 3.4, Şekil 3.2).

Çizelge 3.4. Hayvanların terminal kan glukoz düzeyleri (mg/dl)

	K	AH	DM	DM+AH
1	116	91	520	463
2	109	89	336	446
3	88	88	350	425
4	92	114	331	600
5	101	98	450	435
6	96	95	450	323
7	112	105	568	368
8	105	113	509	372
9	91	89	440	374
10	86	99	472	494
ORT ± SS	102,20 ± 10,20	98,10 ± 9,72	442,60 ± 81,31	430,00 ± 79,01



Şekil 3.2. Hayvanların terminal kan glukoz düzeyleri

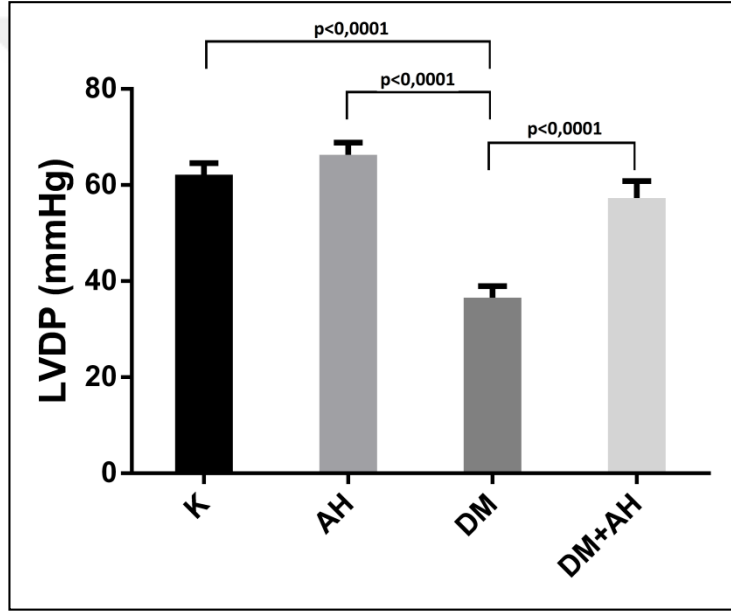
3.2. Sol Ventrikül Fonksiyonu Ölçümleri

3.2.1. Bazal Fonksiyon Ölçümleri

Çalışmanın bazal fonksiyon ölçümleri ile ilgili bulguları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde sol ventrikül fonksiyon parametrelerinin (LVDP, +dP/dt, -dP/dt) DM grubunda; K, AH ve DM+AH gruplarına göre istatistiksel olarak önemli ölçüde düşük olduğu saptanmıştır (Çizelge 3.5, 3.6; Şekil 3.3, 3.4).

Çizelge 3.5. Sol ventrikül gelişimsel basıncı (LVDP) değerleri (mmHg).

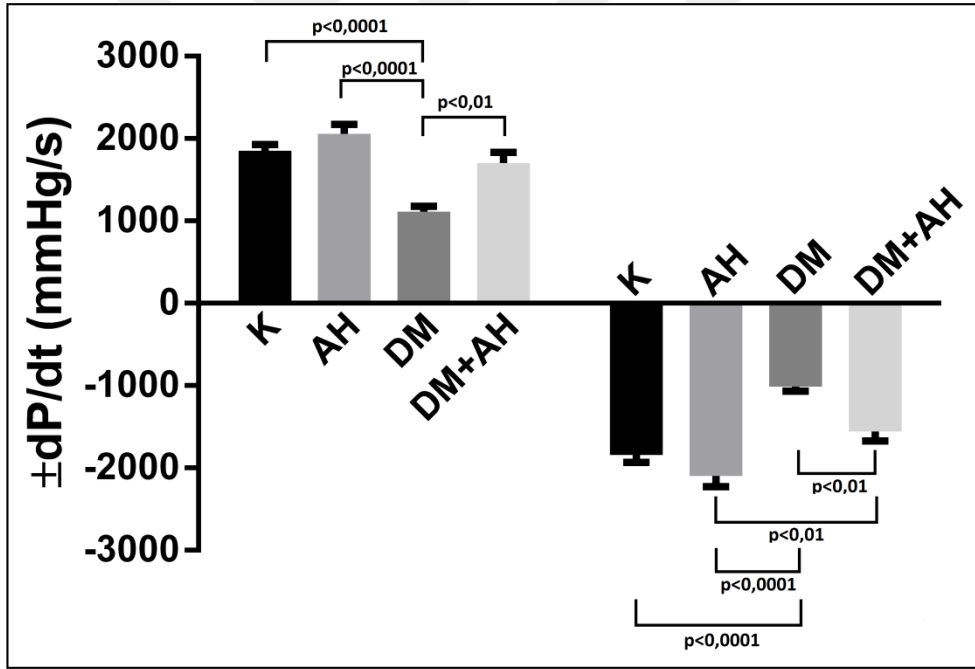
	K	AH	DM	DM + AH
1	63,42	61,63	44,06	42,79
2	54,63	70,97	50,71	48,54
3	71,87	73,72	39,59	75,46
4	60,20	60,89	25,01	50,52
5	45,86	54,37	36,38	61,29
6	59,59	75,82	32,77	63,01
7	69,35	65,42	27,10	74,29
8	65,35	73,29	37,43	55,79
9	63,77	55,49	34,33	52,54
10	67,59	71,61	38,36	49,02
ORT ± SS	62,16 ± 7,62	66,32 ± 7,86	36,57 ± 7,54	57,33 ± 11,02



Şekil 3.3. Sol ventrikül gelişimsel basıncı ortalama değerleri (LVDP). (ort±SH)

Çizelge 3.6. Basınç gelişim hızı (+dP/dt) ve basınç bozunum hızı (-dP/dt) değerleri (mmHg/s).

K		AH		DM		DM + AH	
+dP/dt	-dP/dt	+dP/dt	-dP/dt	+dP/dt	-dP/dt	+dP/dt	-dP/dt
1859,19	-1818,20	1878,84	-1740,03	1415,21	-1367,10	1247,88	-1160,04
1803,69	-1736,09	2309,71	-2486,74	1098,31	-997,20	1878,22	-1688,34
2234,14	-2300,79	2353,54	-2544,08	1106,57	-1060,44	1997,75	-1524,02
1504,66	-1544,79	1752,30	-1849,83	810,01	-743,17	1320,98	-1312,26
1512,09	-1436,12	1427,90	-1619,86	1343,03	-1094,96	2249,74	-2090,32
1631,63	-1672,32	2298,79	-2435,33	1013,92	-869,84	1993,31	-1493,08
2182,47	-2317,04	2441,01	-2207,43	813,14	-787,92	2157,03	-2214,18
2005,50	-1889,63	2483,37	-2621,37	1110,63	-1038,96	1398,48	-1487,77
1834,28	-1850,98	1593,37	-1546,58	1143,01	-1033,16	1656,71	-1499,38
1932,66	-1848,86	2014,69	-1943,23	1288,25	-1116,02	1135,31	-1130,22
1850,03	-1841,48	2055,35	-2099,45	1114,21	-1010,88	1703,54	-1559,96
±	±	±	±	±	±	±	±
252,26	285,23	376,62	407,72	202,11	179,57	405,13	356,90



Şekil 3.4. Basınç gelişim hızı (+dP/dt) ve basınç bozunum hızı (-dP/dt) ortalama değerleri.

3.2.2. İnotropik Rezerv Ölçümleri

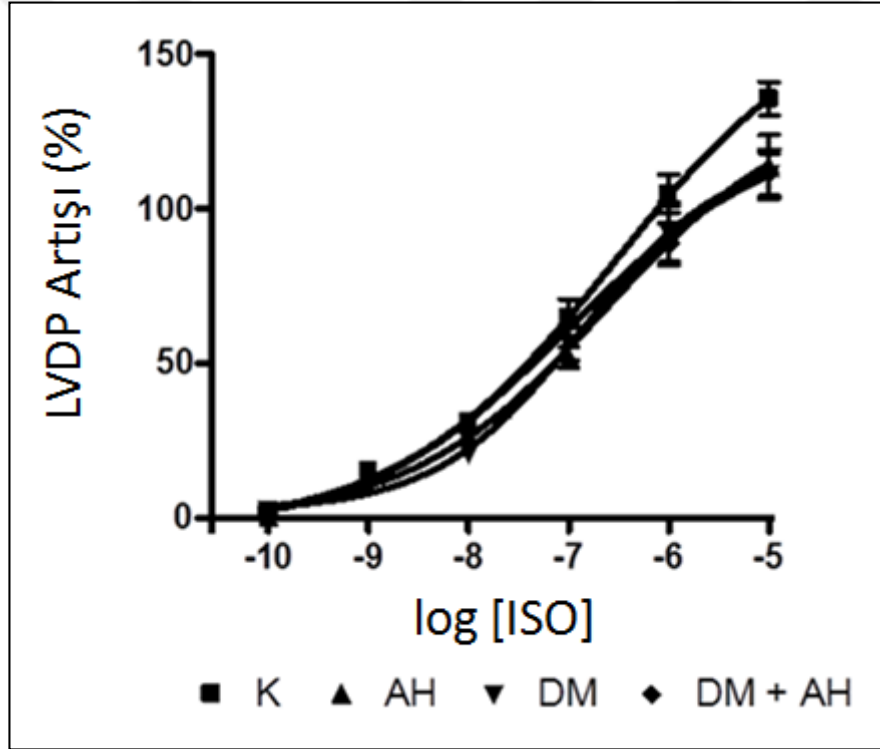
β agonist isoproterenol uygulaması ile saptanan doz-cevap değerleri (Çizelge 3.7), doz-cevap eğrileri (Şekil 3.5) ve EC_{50} (maksimal yanıtı neden olan konsantrasyonun %50 si) değerleri (Çizelge 3.8) aşağıda verilmiştir. EC_{50} değerleri grupların regresyon katsayıları baz alınarak karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 3.7. İsoproterenolün artan dozlarına verilen yanıt artışı (% artış olarak verilmiştir. % artış = [İlaç uygulaması ile elde edilen LVDP değeri/ İlaç uygulaması öncesi LVDP değeri] x 100 – 100).

	10⁻¹⁰ M	10⁻⁹ M	10⁻⁸ M	10⁻⁷ M	10⁻⁶ M	10⁻⁵ M
K1	0,91	30,49	46,44	66,98	127,53	134,10
K2	2,58	17,51	41,56	90,96	123,20	148,41
K3	0,18	8,09	33,67	55,02	83,66	115,53
K4	1,33	11,93	24,56	66,81	97,27	131,50
K5	0,31	11,48	24,08	44,26	81,18	118,05
K6	2,37	14,07	20,73	40,66	101,36	148,72
K7	0,94	11,04	21,75	46,45	88,56	119,66
K8	2,60	14,02	32,44	67,18	98,99	123,72
K9	1,82	22,73	37,53	100,12	141,36	165,89
K10	2,95	8,99	26,05	68,15	104,86	149,86
Ort ± SS	1,60±1,00	15,04±6,91	30,88±8,86	64,66±19,42	104,80±19,90	135,54±16,94
AH1	2,14	15,92	25,20	38,27	60,85	75,38
AH2	0,04	19,62	21,57	50,79	91,93	96,27
AH3	0,38	9,16	17,33	39,50	58,22	75,82
AH4	0,18	5,07	20,96	61,51	93,58	121,14
AH5	1,16	3,37	25,56	48,16	70,78	116,03
AH6	0,24	16,80	38,82	45,65	95,21	130,35
AH7	0,89	19,84	29,59	52,83	116,26	141,42
AH8	0,96	12,29	13,16	49,96	56,25	74,74
AH9	0,92	15,48	32,66	71,79	128,55	129,62
AH10	0,54	25,60	38,87	60,52	148,86	174,18
Ort ± SS	0,76±0,62	14,32±6,93	26,37±8,64	51,90±10,33	92,05±31,64	113,50±32,90
DM1	3,65	12,94	27,08	88,22	107,99	136,20
DM2	0,59	10,69	17,18	66,02	92,57	128,06
DM3	2,95	6,36	13,41	60,04	91,31	130,42
DM4	3,96	6,81	22,59	41,88	108,63	97,22
DM5	2,11	14,68	21,19	33,00	67,75	72,51
DM6	3,96	5,79	19,55	49,46	158,48	104,23
DM7	3,32	17,16	23,90	44,11	62,12	137,71
DM8	1,52	8,77	23,03	44,73	93,30	111,04
DM9	0,41	9,67	18,61	63,61	66,33	88,98
DM10	0,58	10,19	22,61	70,16	71,00	104,81
Ort ± SS	2,31±1,45	10,31±3,71	20,92±3,87	56,12±16,51	91,95±28,94	111,12±21,75
DM+AH 1	0,49	19,09	31,92	79,11	90,54	150,41

Çizelge 3.7. Devam. İzoproterenolün artan dozlarına verilen yanıt artışı (% artış olarak verilmiştir. % artış = [İlaç uygulaması ile elde edilen LVDP değeri/ İlaç uygulaması öncesi LVDP değeri] x 100 – 100).

DM+AH 2	0,95	10,74	30,52	71,97	120,71	105,58
DM+AH 3	0,72	18,11	24,35	54,63	55,70	90,28
DM+AH 4	0,44	12,74	36,64	69,37	94,57	113,42
DM+AH 5	0,99	19,71	25,98	61,22	98,10	120,83
DM+AH 6	1,90	11,36	27,03	66,44	110,37	138,90
DM+AH 7	1,16	8,25	13,90	70,07	74,36	84,54
DM+AH 8	1,55	16,81	31,06	59,07	66,05	108,59
DM+AH 9	5,52	17,60	31,12	71,74	105,19	129,32
DM+AH10	1,84	12,02	23,98	48,09	70,03	73,55
Ort ± SS	1,56±1,48	14,64±4,06	27,65±6,21	65,17±9,33	88,56±21,21	111,54±24,34



Şekil 3.5. Deney gruplarına ait izoproterenol doz-cevap eğrileri.

Çizelge 3.8. İzoproterenol EC₅₀ değerleri (logaritmik).

	K	AH	DM	DM+AH
Log[EC₅₀] değerleri	-6,55	-6,63	-6,87	-7,00

3.3. Molekül Çalışması İçin Alınan Hayvanların Takip Değerleri

Molekül çalışması için alınan hayvanların, başlangıç ve terminal vücut ağırlıkları Çizelge 3.9’da verilmiştir. Deney gruplarına ait başlangıç vücut ağırlığı değerleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

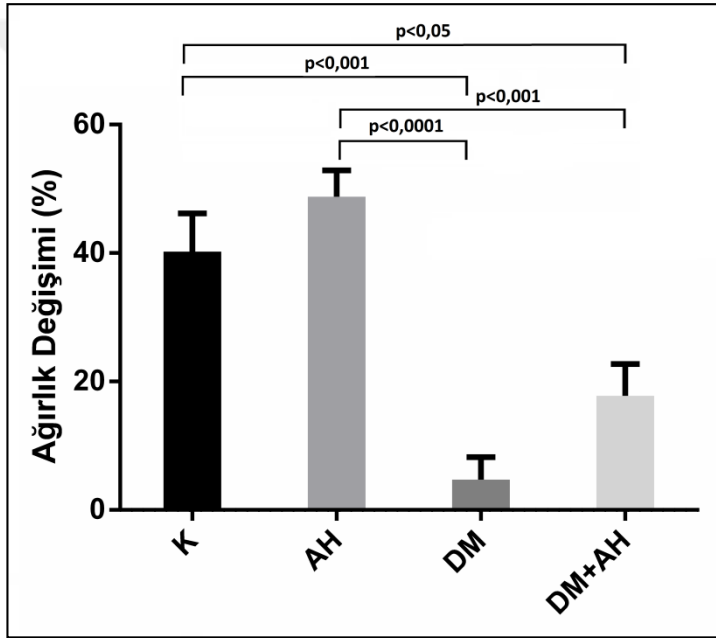
Çizelge 3.9. Molekül çalışmasında kullanılan hayvanların başlangıç (Baş.) ve terminal vücut ağırlıkları (Son) (g)

	K		AH		DM		DM+AH	
	Baş.	Son	Baş.	Son	Baş.	Son	Baş.	Son
1	212	264	261	351	192	198	252	281
2	311	422	295	408	247	314	229	316
3	226	339	249	346	258	290	283	295
4	260	346	192	377	226	257	235	273
5	230	303	231	358	255	335	191	346
6	232	337	252	419	256	281	245	321
7	240	269	203	327	222	273	280	224
8	236	403	249	373	236	224	296	303
9	225	199	240	383	244	230	218	288
10	230	365	236	320	-	-	250	267
	240,20	324,70	240,80	366,20	237,33	266,89	247,90	291,40
Ort $\pm$ SS	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	27,74	67,57	28,94	32,24	21,35	44,26	32,08	33,68

Hayvanların vücut ağırlığı değişimi (%) değerleri karşılaştırıldığında ise gruplar arasında fark saptanmıştır ($p<0,01$). Post-Hoc analiz bu farkın, K ($40,20 \pm 17,95$) ve DM ($12,18 \pm 13,31$); K ($40,20 \pm 17,95$) ve DM+AH ($13,58 \pm 18,17$); AH ($48,78 \pm 12,24$) ve DM ($12,18 \pm 13,31$); AH ($48,78 \pm 12,24$) ve DM+AH ($13,58 \pm 18,17$) grupları arasında olduğu göstermektedir (Çizelge 3.10, Şekil 3.6).

Çizelge 3.10. Molekül çalışmasında kullanılan hayvanların vücut ağırlığı değişimi (%)

	K	AH	DM	DM+AH
1	24,53	34,48	3,13	11,51
2	35,69	38,31	-	37,99
3	50,00	38,96	12,40	4,24
4	33,08	-	13,72	16,17
5	31,74	54,98	-	81,15
6	45,26	66,27	9,77	31,02
7	12,08	61,08	-	-
8	70,76	49,80	-5,08	2,36
9	-	59,58	-5,74	32,11
10	58,70	35,59	-	6,80
Ort ± SS	40,20 ± 17,95	48,78 ± 12,24	4,70 ± 8,64	17,78 ± 14,00

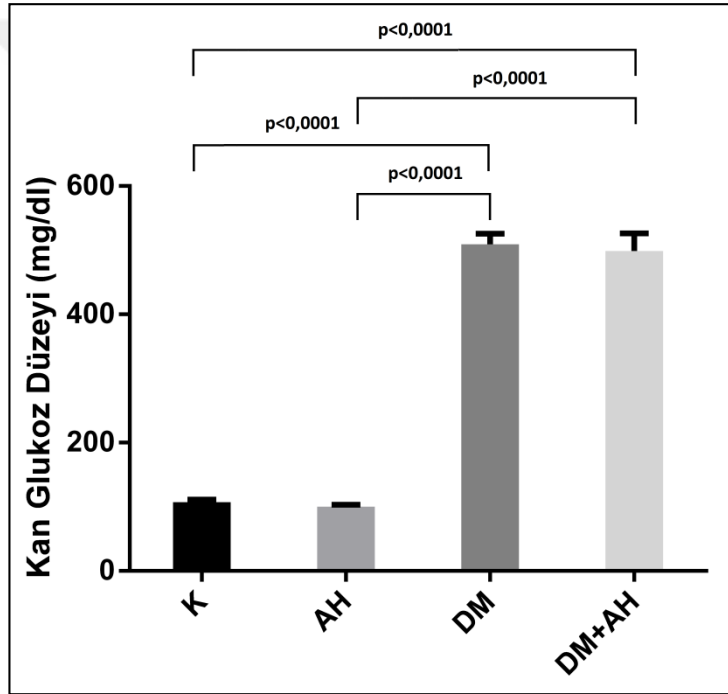


Şekil 3.6. Molekül çalışması için kullanılan hayvanların, deney protokolü süresince vücut ağırlıklarında meydana gelen değişim (%)

Fonksiyon çalışmasına dahil edilen hayvanların, terminal (sakrifikasyon öncesi) kan glukoz düzeyleri gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli fark göstermektedir ($p<0,001$). Post-Hoc analiz bu farkın K ve DM; K ve DM+AH; AH ve DM; AH ve DM+AH grupları arasında olduğunu ortaya koymaktadır (Çizelge 3.11; Şekil 3.7).

Çizelge 3.11. Hayvanların terminal kan glukoz düzeyleri (mg/dl)

	K	AH	DM	DM+AH
1	108	104	488	560
2	120	115	485	369
3	111	96	495	445
4	110	103	589	508
5	98	114	419	483
6	125	93	513	381
7	111	87	531	448
8	94	104	566	600
9	79	92	499	600
10	115	92	-	592
Ort ± SS	107,10 ± 13,47	100,00 ± 9,57	509,44 ± 49,45	498,60 ± 87,84



Şekil 3.7. Hayvanların terminal kan glukoz düzeyleri

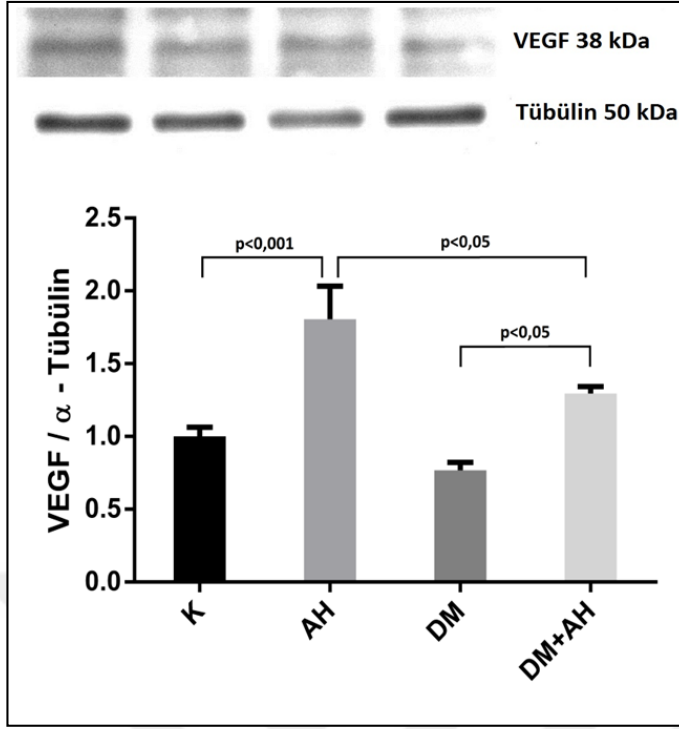
3.4. Western Blot Yöntemi ile Protein Düzeylerinin İncelenmesi

3.4.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Deney gruplarına ait sol ventrikül VEGF ekspresyon düzeyleri Çizelge 3.12 ve Şekil 3.8’de belirtilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirme ile K ($1,00 \pm 0,20$) ve AH ($1,81 \pm 0,56$), AH ($1,81 \pm 0,56$) ve DM+AH ($1,29 \pm 0,11$), DM ($0,77 \pm 0,13$) ve DM+AH ($1,29 \pm 0,11$) grupları arasında önemli fark bulunmuştur.

Çizelge 3.12. Sol ventrikül VEGF protein ekspresyon düzeyleri

	K	AH	DM	DM+AH
1	0,94	1,63	-	-
2	1,06	2,53	-	1,13
3	1,35	2,34	0,66	1,39
4	0,65	1,84	0,92	1,30
5	0,80	1,44	0,68	1,39
6	1,20	-	0,62	-
7	1,12	1,05	0,92	1,26
8	0,88	-	0,80	-
9	1,05	-	-	-
10	0,95	-	-	-
ORT±SS	1,00 ± 0,20	1,81 ± 0,56	0,77± 0,13	1,29 ± 0,11



Şekil 3.8. Sol ventrikül VEGF protein ekspresyon düzeyleri

3.4.2. Prolil Hidroksilazlar (PHD2 ve PHD3)

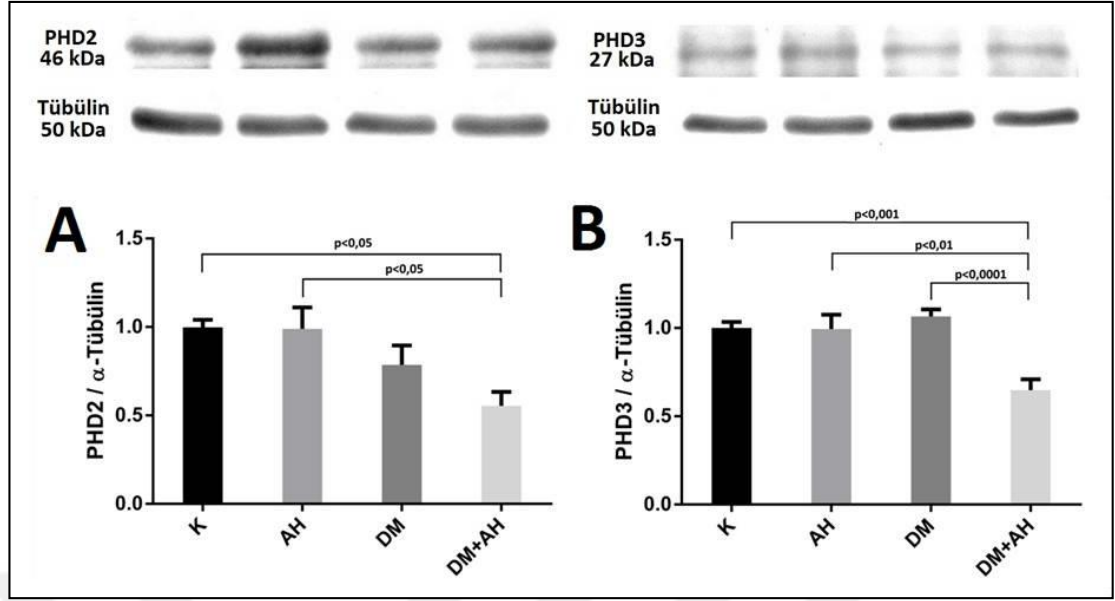
Deney gruplarına ait sol ventrikül PHD2 ve PHD3 ekspresyon düzeyleri Çizelge 3.13 ve 3.14 ile Şekil 3.9'da verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede PHD2 protein düzeyinin DM+AH grubunda ($0,56 \pm 0,19$); K ($1,00 \pm 0,12$) ve AH ($0,99 \pm 0,37$) gruplarına göre, PHD3 protein düzeyinin ise DM+AH grubunda ($0,65 \pm 0,16$); K ($1,00 \pm 0,09$), AH ($0,99 \pm 0,18$) ve DM ($1,07 \pm 0,11$) gruplarına göre önemli düzeyde düşük olduğu saptanmıştır.

Çizelge 3.13. Sol ventrikül PHD2 protein ekspresyon düzeyleri

	K	AH	DM	DMAH
1	0,91	1,17	1,20	0,64
2	1,18	0,98	-	-
3	1,00	1,14	1,09	-
4	1,11	1,66	0,63	0,78
5	0,79	0,57	-	0,69
6	1,00	0,87	0,96	-
7	1,00	0,69	0,50	0,57
8	1,00	1,28	0,51	0,35
9	-	0,54	0,61	0,30
10	-	-	-	-
ORT±SS	1,00 ± 0,12	0,99 ± 0,37	0,75 ± 0,29	0,56 ± 0,19

Çizelge 3.14. Sol ventrikül PHD3 protein ekspresyon düzeyleri

	K	AH	DM	DMAH
1	1,00	1,20	1,06	0,74
2	1,00	0,76	1,10	0,63
3	1,00	1,14	1,18	0,94
4	-	-	-	-
5	-	-	1,16	-
6	1,00	-	-	0,56
7	0,84	-	0,90	0,54
8	1,16	0,99	0,95	0,44
9	1,00	0,88	1,11	0,69
10	-	-	-	-
ORT±SS	1,00 ± 0,09	0,99 ± 0,18	1,07 ± 0,11	0,65 ± 0,16



Şekil 3.9. Sol ventrikül (A) PHD2 ve (B) PHD3 protein ekspresyon düzeyleri

3.4.3. Matriks Metalloproteinazları (MMP-2 ve MMP-9)

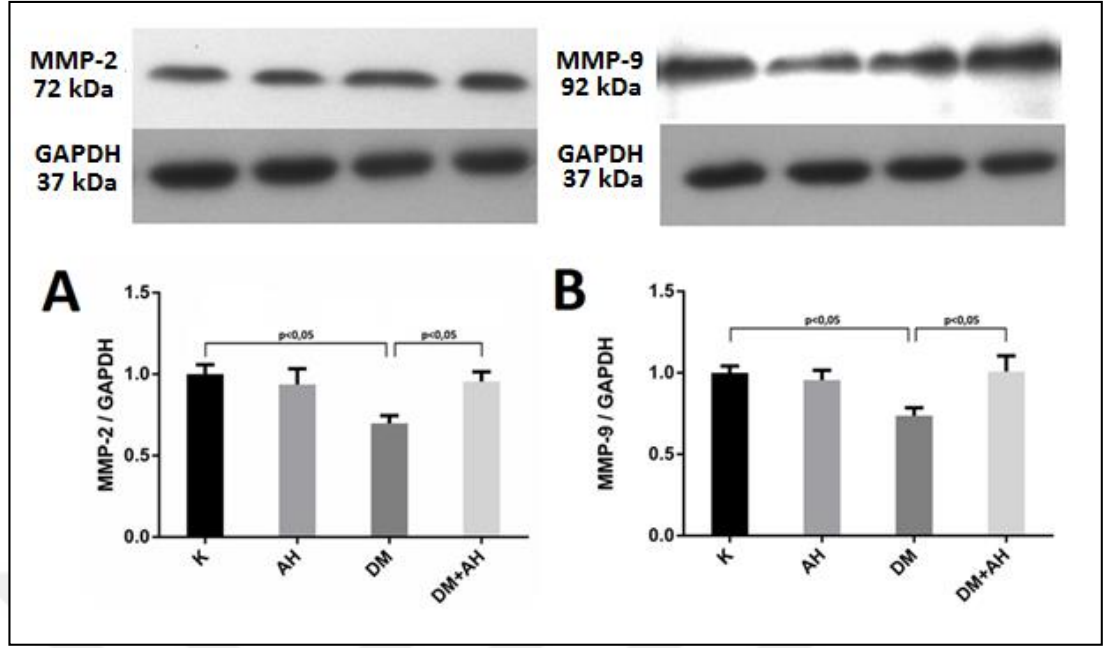
Deney gruplarına ait sol ventrikül MMP-2 ve MMP-9 protein ekspresyon düzeyleri Çizelge 3.15. ve 3.16. ile Şekil 3.10'da verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede MMP-2 protein düzeyinin K ($1,00 \pm 0,15$) ve DM ($0,70 \pm 0,13$); DM ($0,70 \pm 0,13$) ve DM+AH ($0,96 \pm 0,14$) grupları arasında, MMP-9 protein düzeyinin K ($1,00 \pm 0,12$) ve DM ($0,74 \pm 0,11$); DM ($0,74 \pm 0,11$) ve DM+AH ($1,01 \pm 0,27$) grupları arasında istatistiksel açıdan önemli fark gösterdiği saptanmıştır.

Çizelge 3.15. Sol ventrikül MMP-2 protein ekspresyon düzeyleri

	K	AH	DM	DMAH
1	0,99	0,85	0,86	0,85
2	0,90	0,90	0,66	0,98
3	1,03	1,04	0,72	0,90
4	1,02	0,92	0,72	0,96
5	1,19	0,92	0,92	0,83
6	1,14	1,51	0,56	1,22
7	0,72	0,55	0,58	-
8	-	0,81	0,58	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
ORT±SS	1,00 ± 0,15	0,94 ± 0,27	0,70 ± 0,13	0,96 ± 0,14

Çizelge 3.16. Sol ventrikül MMP-9 protein ekspresyon düzeyleri

	K	AH	DM	DMAH
1	0,80	0,75	0,66	0,77
2	0,98	0,91	0,85	0,85
3	1,12	1,13	0,85	0,99
4	1,13	1,27	0,72	1,61
5	1,07	0,95	0,61	1,18
6	1,07	0,89	-	0,86
7	0,93	0,94	-	0,92
8	0,91	0,81	-	0,89
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
ORT±SS	1,00 ± 0,12	0,96 ± 0,17	0,74 ± 0,11	1,01 ± 0,27



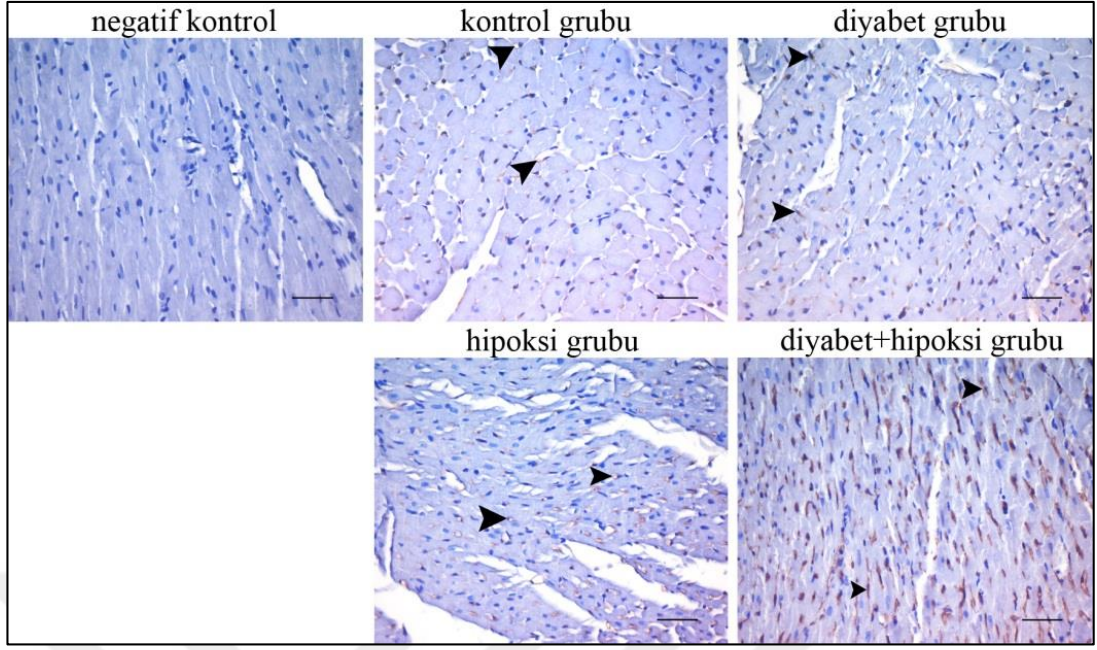
Şekil 3.10. Sol ventrikül (A) MMP-2 ve (B) MMP-9 protein ekspresyon düzeyleri

3.5. Miyokardiyal Kapiller Yoğunluk

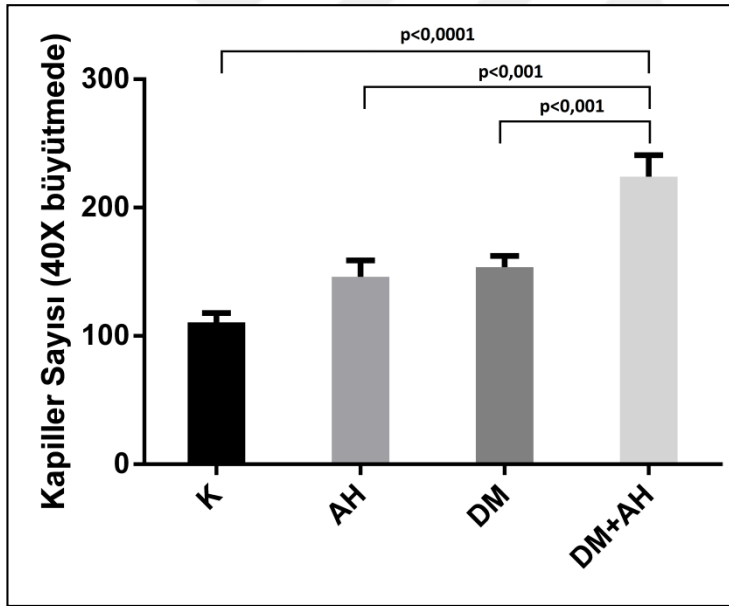
Deney gruplarına ait sol ventrikül kapiller yoğunluk değerleri Çizelge 3.17 ile Şekil 3.11 ve Şekil 3.12’de verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede DM+AH ($224,00 \pm 37,60$) grubu ile K ($110,70 \pm 17,40$), AH ($146,00 \pm 28,93$) ve DM ($153,60 \pm 19,42$) grupları arasında önemli fark bulunmuştur.

Çizelge 3.17. Sol ventrikül kapiller yoğunlukları (40X büyütmede)

	K	AH	DM	DM+AH
1	119	190	157	251
2	106	115	127	243
3	99	155	-	232
4	85	143	142	-
5	122	-	176	236
6	133	127	166	158
ORT±SS	110,70 ± 17,40	146,00 ± 28,93	153,60 ± 19,42	224,00 ± 37,60



Şekil 3.11. Anti-caveolin 1 immünohistokimya boyaması. **Ok:** damar endotel hücreleri (Bar: 50 µm).



Şekil 3.12. Sol ventrikül kapiller yoğunlukları (40X büyütmede)

3.6. Redoks Statusu

3.6.1. Serum Oksidan ve Antioksidan Status Ölçümleri

Deney gruplarına ait serum oksidan ve antioksidan status ölçümleri ile serum oksidatif stres indeksi (OSİ) değerleri aşağıda tablo ve grafikler halinde verilmiştir (Çizelge 3.18; 3.19 ve 3.20 ile Şekil 3.13).

Çizelge 3.18. Serum Total Oksidan Status Değerleri

	K	AH	DM	DM+AH
1	6,88	7,89	8,02	6,66
2	8,23	7,25	8,70	7,77
3	10,18	9,13	4,93	10,02
4	11,81	10,29	5,36	7,45
5	8,31	10,08	7,94	8,25
6	10,07	6,69	12,78	13,53
7	5,88	7,85	8,18	6,66
8	4,58	6,16	5,74	9,47
9	7,33	9,70	9,12	15,55
10	7,70	6,90	-	7,31
Ort ± SS	8,10 ± 2,15	8,19 ± 1,50	7,86 ± 2,40	9,27 ± 3,02

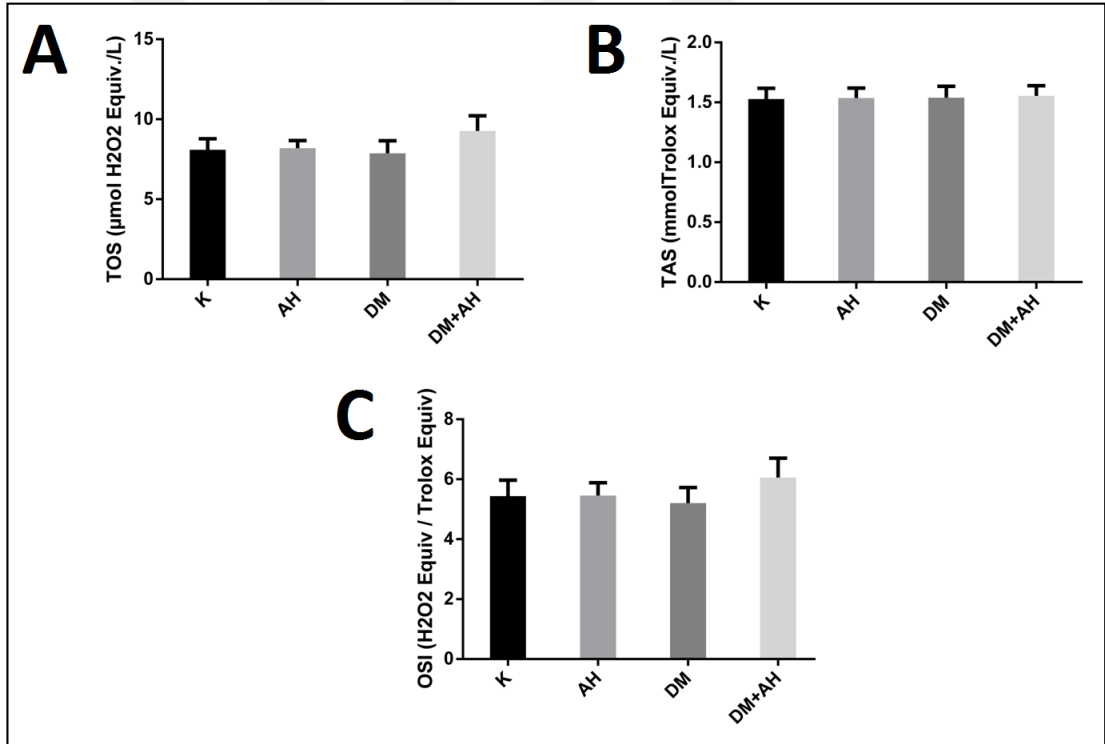
Çizelge 3.19. Serum Total Antioksidan Status Değerleri

	K	AH	DM	DM+AH
1	1,78	1,32	1,37	1,52
2	2,04	1,49	1,25	1,68
3	1,52	1,85	1,59	1,54
4	1,52	1,34	1,73	1,55
5	1,76	1,87	1,35	2,04
6	1,33	1,59	1,72	1,88
7	1,52	1,89	2,06	1,19
8	1,25	1,25	1,15	1,18
9	1,50	1,21	1,63	1,48
10	1,06	1,55	-	1,49
ORT ± SS	1,53 ± 0,28	1,54 ± 0,26	1,54 ± 0,29	1,56 ± 0,27

Çizelge 3.20. Serum Oksidatif Status İndeksi Değerleri (OSİ=TOS/TAS)

	K	AH	DM	DM+AH
1	3,87	5,96	5,85	4,37
2	4,03	4,88	6,94	4,62
3	6,71	4,93	3,11	6,50
4	7,79	7,67	3,09	4,81
5	4,73	5,38	5,87	4,05
6	7,54	4,20	7,45	7,21
7	3,87	4,16	3,98	5,60
8	3,67	4,93	4,97	7,99
9	4,89	7,99	5,59	10,52
10	7,25	4,44	-	4,90
ORT ± SS	5,44 ± 1,69	5,45 ± 1,36	5,21 ± 1,56	6,06 ± 2,03

Kan serumlarından yapılan TAS ve TOS ölçümleri ve bu ölçümlerin birbirine oranlanması (TOS/TAS) ile hesaplanan OSI değerleri açısından istatistiksel olarak gruplar arasında önemli bir fark bulunmamıştır.



Şekil 3.13. Serum (A) Total oksidan status (B) Total antioksidan status (C) Oksidatif status indeks değerleri

3.6.2. Miyokardiyal Oksidan ve Antioksidan Status Ölçümleri

Deney gruplarına ait miyokardiyal oksidan ve antioksidan status ölçümleri ile kardiyak oksidatif stres indeksi (OSİ) değerleri aşağıda tablo ve grafikler halinde verilmiştir (Çizelge 3.21; 3.22 ve 3.23 ile Şekil 3.14).

Çizelge 3.21. Miyokardiyal Total Oksidan Status Değerleri

	K	AH	DM	DM+AH
1	12,93	14,33	16,93	11,53
2	17,49	15,49	15,91	10,19
3	14,93	13,22	22,88	16,19
4	15,26	18,14	19,35	12,93
5	12,14	15,93	18,98	14,56
6	7,21	17,43	23,21	14,19
7	17,26	14,36	17,02	14,65
8	16,23	16,11	17,26	12,19
9	-	21,58	17,58	14,70
10	15,67	17,91	-	14,84
ORT ± SS	14,35 ± 3,21	16,45 ± 2,42	18,79 ± 2,63	13,60 ± 1,83

Çizelge 3.22. Miyokardiyal Total Antioksidan Status Değerleri

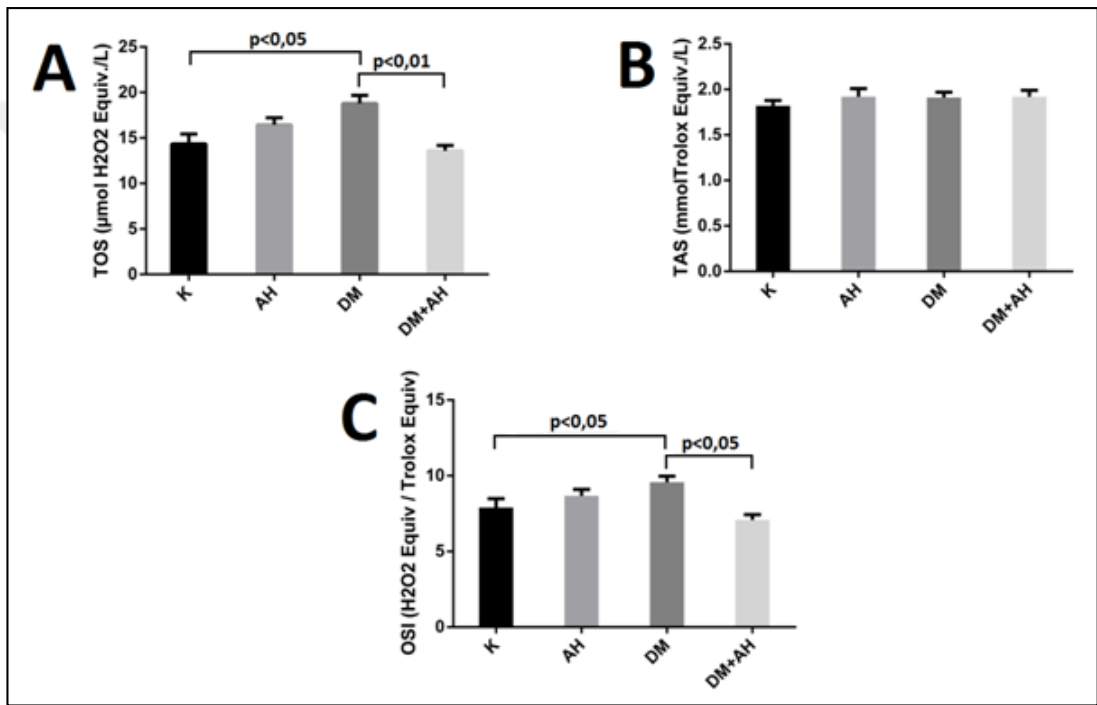
	K	AH	DM	DM+AH
1	1,88	1,94	1,99	1,60
2	1,86	1,85	1,89	2,00
3	1,70	1,98	2,07	2,12
4	1,80	2,30	2,07	2,13
5	1,69	1,55	1,73	1,75
6	1,71	1,97	-	1,83
7	2,16	1,58	1,73	-
8	1,58	2,01	2,09	1,80
9	-	2,40	1,73	2,25
10	1,99	1,61	-	1,79
ORT ± SS	1,82 ± 0,18	1,82 ± 0,18	1,91 ± 0,16	1,92 ± 0,22

Çizelge 3.23. Miyokardiyal Oksidatif Status İndeksi Değerleri (OSİ=TOS/TAS)

	K	AH	DM	DM+AH
1	6,88	7,37	8,52	7,20
2	9,38	8,35	8,40	5,08
3	8,77	6,69	11,04	7,64
4	8,49	7,87	9,35	6,06
5	7,16	10,30	10,98	8,33
6	4,22	8,87	-	7,77
7	7,99	9,07	9,85	-
8	-	8,00	8,26	6,75
9	-	9,00	10,18	6,55
10	7,89	11,15	-	8,30
ORT ± SS	7,60 ± 1,59	8,67 ± 1,33	9,57 ± 1,12	7,07 ± 1,08

Sol ventrikül dokusunda yapılan,

TOS ölçümleri açısından K ($14,35 \pm 3,21$) ile DM ($18,79 \pm 2,63$) ve DM ($18,79 \pm 2,63$) ile DM+AH ($13,60 \pm 1,83$) grupları arasında istatistiksel açıdan önemli fark bulunmuştur. OSI ölçümleri açısından K ($7,60 \pm 1,59$) ile DM ($9,57 \pm 1,12$) ve DM ($9,57 \pm 1,12$) ile DM+AH ($7,07 \pm 1,08$) grupları arasında istatistiksel açıdan önemli fark bulunmuştur. TAS ölçümleri açısından istatistiksel olarak gruplar arasında önemli bir fark bulunmamıştır.



Şekil 3.14. Miyokardiyal (A) Total oksidan status (B) Total antioksidan status (C) Oksidatif status indeks değerleri

4. TARTIŞMA

Tez çalışmamızın bulguları; hayvan takip değerleri, sol ventrikül fonksiyon ölçümleri, sol ventrikül VEGF proteini ve kapiller yoğunluk düzeyleri, sol ventrikül PHD protein düzeyleri, sol ventrikül MMP protein düzeyleri ile serum ve miyokardiyal redoks statusu başlıkları altında tartışılmıştır.

4.1. Hayvan Takip Değerleri (Vücut Ağırlığı, Kalp Ağırlığı ve Glukoz Düzeyleri):

Fonksiyon ve molekül gruplarına dahil hayvanların 42 günlük deney protokolü süresince vücut ağırlıklarında meydana gelen değişimler (%) karşılaştırıldığında; diyabetik hayvanların vücut ağırlıklarında meydana gelen artış non-diyabetik hayvanlara göre önemli derecede düşüktür. STZ ile indüklenen Tip I diyabetik hayvanların non-diyabetik hayvanlara göre daha düşük vücut ağırlığına sahip olduğu bilinmektedir (Chatzigeorgiou ve ark., 2009; Rees ve ark., 2005). Öte yandan, aralıklı hipoksi uygulamasının diyabetik ve non-diyabetik hayvanlarda vücut ağırlığı üzerinde etkili olmadığı anlaşılmaktadır.

Hipoksi genel olarak vücut ağırlığında azalmaya neden olur (West ve ark., 2007). Herrera ve ark.(2015), uyguladıkları 32 günlük aralıklı hipoksi ($PO_2=90\text{mmHg}$) protokolünün sonunda, hipoksi uygulanan hayvanların ağırlıklarının kontrol grubuna göre %18,9 daha düşük olduğunu ve bu farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu bildirmişlerdir (Herrera ve ark., 2015). Park ve Suzuki (2007), 2 dakika %6'lık PO_2 'yi, 2 dakika %21 PO_2 'nin takip ettiği aralıklı hipoksi siklusunu günde 8 saat, 1, 2 ve 4 haftalık süre boyunca uygulamışlar, aralıklı hipoksi grubundaki hayvanların vücut ağırlıkları kontrol grubuna göre 1, 2 ve 4. haftalarda önemli derecede düşük olduğunu saptamışlardır (Park ve Suzuki, 2007).

Yukarıda örneklenen makalelerde uygulanan aralıklı hipoksi protokollerindeki hipoksi şiddeti tez çalışmamızdakinden fazladır. Buradan hareketle tez çalışmamızdaki hipoksinin ağırlık kaybına yol açacak şiddette olmadığı öne

sürülebilir. Ek olarak, diyabetiklere uygulanan aralıklı hipoksinin, istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte diyabetteki ağırlık kaybı eğilimini azalttığı göze çarpmaktadır. Bu azalış aralıklı hipoksinin glukoz metabolizmasında olumlu yönde etkiler yaptığını düşündürmekle birlikte, tez çalışmamızda bu yargıyı kesinleştirecek şekilde beslenme takibi ve metabolik parametre ölçümleri yapılmamıştır.

Kalp ağırlığının vücut ağırlığına bölünmesi ile elde edilen KA/VA oranlarında gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark saptanmamıştır. Kalp hipertrofisi diyabetik kardiyomiyopatinin karakteristik özelliklerinden biridir. Diyabetik hayvanlarda kalp ağırlığının önemli ölçüde artmış olduğunu gösteren birçok çalışmada (Lahaye ve ark., 2010; Ooie ve ark., 2003; Ravingerova ve ark., 2000; Riva ve ark., 1998; Subramanian ve ark., 2006) diyabet süresi çalışmamızdakine göre daha uzundur. Buijs ve ark. (2005), STZ ile indükledikleri 4 haftalık diyabet modelinde KA/VA değerlerinin, kontrol ve diyabet grupları arasında önemli fark göstermediğini bildirmişlerdir. (Buijs ve ark., 2005). Zhang ve ark. (2002), STZ ile indüklenen 2 ve 8 haftalık tip I diyabetik hayvanlarla yaptıkları çalışmada, 2 haftalık diyabette KA/VA oranlarının değişmediğini ancak 8. haftada diyabetiklerde kontrol grubuna göre önemli derecede arttığını rapor etmişlerdir (Zhang ve ark., 2002). Joyeux ve ark. (1999), STZ ile indüklenen 9 haftalık tip I diyabet modelinde KA/VA oranının kontrol ve diyabet grubu arasında önemli fark göstermediğini bildirmişlerdir (Joyeux ve ark., 1999). Tuncay ve ark. (2007), da 4 haftalık diyabetik hayvanlarda kontrol grubuna göre KA/VA oranları arasında önemli fark saptamamışlardır (Tuncay ve ark., 2007). Faramoushi ve ark. (2016), oluşturdukları 8 haftalık tip II diyabet modelinde KA/VA oranının diyabet ve kontrol grubu arasında önemli fark göstermediğini bildirmişlerdir (Faramoushi ve ark., 2016). Tez çalışmamızda, diyabet gruplarında MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinde saptanan azalma fibrotik bir değişime işaret etmekle birlikte, yapısal değişikliklerin henüz kalp ağırlığını değiştirecek düzeye ulaşmadığı ve çalışmamızdaki diyabet süresinin (6 hafta) hipertrofi gelişimi için yeterli olmadığını anlaşılmaktadır.

Tez çalışmamızda, aralıklı hipoksinin normoglisemik ve diyabetik gruplarda KA/VA oranı üzerinde etkili olmadığı gözlenmiştir. Hipoksinin KA/VA oranına etkisi ile ilgili literatürde çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Birot ve ark. (2004), 5500 metre

yükseltiye denk 25 günlük kronik hipoksi protokolü uygulaması yaptıkları çalışmalarında sol ventrikül ağırlığı/vücut ağırlığı değerlerinde kontrol ve kronik hipoksi uygulanan grup arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulmamışlardır (Biro ve ark., 2004).

Fonksiyon ve molekül gruplarına dahil hayvanların kan glukoz düzeyleri STZ uygulanan gruplarda (DM ve DM+AH) STZ uygulanmayan gruplara (K ve AH) göre yüksek bulunmuştur. Diğer taraftan aralıklı hipoksi uygulamasının diyabetik ve non-diyabetik hayvanlarda kan glukoz düzeyleri üzerinde etkisinin olmadığı anlaşılmaktadır.

4.2. Sol Ventrikül Fonksiyon Ölçümleri:

Çalışmamızın bazal fonksiyon ölçümleri ile ilgili olarak elde edilen ve istatistiksel olarak değerlendirilen bulguları; diyabetin sol ventrikül fonksiyon parametrelerinde önemli bozulmaya neden olduğunu ve 42 gün süreyle, günde 6 saat, yaklaşık 3000 m yükseltiyi (520 mmHg) simüle eden hipoksi ($PO_2 \approx \%14$) uygulamasının diyabetik kalpte saptanan fonksiyon bozukluğunu önleyici bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

45 mg/kg ila 200 mg/kg'lık doz aralığında STZ uygulaması ile diyabet oluşturulan ve diyabet süreleri 1 hafta ile 6 ay arasında değişen hayvan çalışmalarından elde edilen fonksiyonel veriler; diyabetin sol ventrikül kontraktıl performansı üzerindeki olumsuz etkisini açıkça ortaya koymaktadır. (Abdel Aziz ve ark., 2008; Cao ve ark., 2012; Lahaye ve ark., 2010; Ligeti ve ark., 2006; Ooie ve ark., 2003; Ravingerova ve ark., 2000; Strniskova ve ark., 2003; Suarez ve ark., 2008; Subramanian ve ark., 2006; Tuncay ve ark., 2007) Çalışmamızda LVDP ve $\pm dP/dt$ değerleri literatürdeki net bilgiyle uyumlu şekilde diyabet (DM) grubunda kontrol (K) grubuna göre önemli düzeyde düşük bulunmuştur. Bu bulgu STZ ile indüklenen kardiyomiyopati modelinin çalışmamızda başarıyla uygulandığını göstermektedir. Öte yandan, aralıklı hipoksi (AH) grubu ile kontrol (K) grubu arasında LVDP ve $\pm dP/dt$ değerleri

açısından herhangi bir fark görülmezken, DM+AH grubundaki bazal fonksiyon parametreleri DM grubuna göre önemli derecede yüksek ve kontrol grubuna göre farksız bulunmuştur. Bu sonuçlardan, tez çalışmamızdaki kronik aralıklı hipoksi uygulaması ile sağlanan hipoksik önkoşullamanın diyabetik kardiyomiyopati sürecinde gelişen kardiyak fonksiyon bozukluğunu önlediği anlaşılmaktadır.

Literatürde *diabetes mellitusta* kronik aralıklı hipoksi uygulamasının koruyucu etkisini inceleyen 2 ayrı çalışmaya rastlanmıştır. Chen ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada STZ (60mg/kg) ile indükledikleri 3 haftalık diyabetik ve non-diyabetik erkek Wistar sıçanlarına 3 hafta boyunca, günde 4 saat, 3000 metre yükseltiye eşdeğer ($PO_2 = \%14$) hipoksi uygulamış ve çeşitli metabolik parametreleri incelemişlerdir. Aralıklı hipoksi uygulanan diyabetiklerde açlık kan şekeri düzeylerinin normoksik diyabetiklere kıyasla önemli düzeyde düşük olduğunu gösteren araştırmacılar, diyabetik hayvanlarda HOMA indeksi değerlerinin de hipoksi uygulamasıyla kontrol değerlerine döndüğünü bildirmişlerdir. Çalışmada açlık plazma insülin değerleri ve pankreas β -hücre miktarları üzerinde ise aralıklı hipoksinin bir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir. Araştırmacılar fonksiyonel bir veri ortaya koymamakla birlikte hipoksik önkoşullamanın diyabette metabolik parametreler üzerinden gelişen koruyucu bir etkisinin olabileceğini öne sürmüşlerdir (Chen ve ark., 2016).

Diyabetik sıçanlara kronik aralıklı hipoksi (AH) uygulaması yapılan Faramoushi ve ark. (2016), na ait diğer çalışmada, 2 haftalık yüksek yağlı diyeti takiben düşük doz STZ uygulayarak oluşturulan diyabetik sıçanlar 8 hafta boyunca, günde 8-12 saat arasında olmak üzere, 3400 metre yükseltiye karşılık gelen hipoksiye maruz bırakılmıştır. Diyabetik hayvanlarda açlık kan şekeri, HOMA indeksi, serum trigliserid ve kolesterol değerleri ile kardiyak GLUT4 proteini ekspresyon düzeyinin hipoksi uygulaması ile düzeldiği gösterilen çalışmada, diyabetik kalpte hipertrofi saptanmazken, histopatolojik incelemelerde diyabetin yol açtığı kardiyak fibrozisin diyabet+AH grubunda gözlenmediği rapor edilmiştir. Araştırmacılar aralıklı hipoksinin kardiyoprotektif etkisini yine metabolik parametrelerdeki düzelme ile açıklamışlardır (Faramoushi ve ark., 2016).

Bu iki çalışma, diyabetin zararlı etkilerinin hipoksik önkoşullama ile önlenebileceğine dair hipotezimiz ve tez çalışmamızın tasarımı dikkate alındığında araştırmamıza benzerlik arz etmekle birlikte, kalp fonksiyonları açısından bir inceleme içermemektedir. Çalışmamızda insülin ölçümü yapılmadığı için elimizde HOMA indeksleri ile ilgili veri bulunmamakla beraber, kan şekeri düzeylerinde hipoksi uygulaması ile birlikte herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bu durumda, hipoksinin –çalışmamızda fonksiyonel verilerle gösterilen- kardiyoprotektif etkisinin yalnızca metabolik parametreler üzerinden açıklanmasının yeterli olmadığı ve metabolik parametrelerden bağımsız olarak da gelişebileceği ileri sürülebilir. Çalışmamız, diyabetik kardiyomiyopatide hipoksik önkoşullamanın koruyucu etkisini fonksiyonel açıdan göstermiş olması ve bu etkinin altında yatan olası moleküler mekanizmaları incelemeyi amaçlaması bakımından özgünlük taşımaktadır.

Çalışmamızda deney gruplarının isoproterenol (ISO) uygulamasına verdikleri yanıtlar arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Literatürde diyabetik kalpteki inotropik rezerv ile ilgili çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Lahaye ve ark. (2010), ile Tuncay ve ark. (2013), bazal kontraktıl fonksiyon ölçümünü takiben 10^{-8} - 10^{-5} M doz aralığında isoproterenol uygulaması yaparak 12 haftalık diyabetik kalpte doz yanıt eğrisinin sağa kaydığını yani aynı dozda ISO uygulamasına verilen inotropik yanıtın azaldığını göstermişlerdir (Lahaye ve ark., 2010; Tuncay ve ark., 2013). Sellers ve Chess-Williams (2001)’a ait 14 günlük diyabetik hayvanlarda β -agonist (isopralin) uygulayarak inotropik yanıtların ölçüldüğü çalışmada, submaksimal dozlarda diyabetik kalplerin daha güçlü yanıt verdiğini belirten araştırmacılar, maksimal dozlarda gruplar arasındaki farkın önemli olmadığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda radyoaktif ligand bağlanma çalışması da yapan araştırmacılar diyabetle birlikte β_1 reseptör yoğunluğu azalırken β_2 reseptör yoğunluğunda artış gözlemlendiğini bildirmişlerdir (Sellers ve Chess-Williams, 2001). Buijs ve ark. (2005), STZ ile indüklenen dört haftalık diyabet modelinde tek doz isoproterenol (5,0 nM) uygulayarak LVDP değerlerinde diyabetik ve non-diyabetik hayvanlar arasında önemli fark saptamamışlardır (Buijs ve ark., 2005). Ligeti ve ark. (2006), STZ ile oluşturdıkları 7 haftalık diyabet sonrasında yaptıkları 5,0 nM isoproterenol uygulamasında sol ventrikül sistolik ve diyastolik basınçlarının değişmediğini, RPP

(Hız Basınç Çarpımı) değerinin ise diyabetlilerde azaldığını göstermişlerdir (Ligeti ve ark., 2006). Kardiyak β -adrenoreseptör duyarlılığının 3 günlük (Wald ve ark., 1989) ve 2 haftalık (Foy ve Lucas, 1978) diyabet periyodunda arttığını bildiren çalışmalar olduğu gibi kimi çalışmalar da β -adrenoreseptörlerin diyabetik kalpte hassasiyet kaybına uğradıklarını öne sürmektedir (Tamada ve ark., 1998; Ha ve ark., 1999). Yukarıda sözü edilen çalışmalardaki çelişkili sonuçları diyabet süresinin farklılığına bağlamak mümkündür. Adrenoreseptör alt tiplerinin incelenmesinin hedeflenmediği tez çalışmamızda, daha yüksek ISO dozlarının uygulanmamış olması ortaya çıkabilecek olası farklılıkları gölgelemesi bakımından çalışmamızın eksik yönlerinden bir tanesini oluşturmaktadır.

4.3. Sol Ventrikül VEGF ve Kapiller Yoğunluk Düzeyleri:

Çalışmamızın sol ventrikül VEGF protein ekspresyon düzeyleri ve sol ventrikül kapiller yoğunluklarına ilişkin bulgularına göre:

- 1) VEGF protein düzeyi DM grubunda K grubuna göre düşük, kapiller dansite DM grubunda K grubuna göre yüksek bulunmuş olmakla birlikte ne VEGF protein düzeyi ne kapiller dansite açısından K grubu ile DM grubu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır. Bu veriler “diyabetin kalpte VEGF ekspresyonu ve damarlanmada azalmaya neden olacağı” yönündeki önermemizi doğrulamamıştır.
- 2) Aralıklı hipoksi uygulaması VEGF protein düzeylerinde non-diyabetik hayvanlarda daha belirgin olmak üzere hem diyabetik hem non-diyabetik hayvanlarda istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olmuştur.
- 3) Aralıklı hipoksi uygulaması diyabetik hayvanlarda damarlanmada önemli artışa neden olurken, non-diyabetik hayvanlarda neden olduğu damarlanma artışı istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.
- 4) VEGF düzeyi AH grubunda DM+AH grubuna göre, kapiller yoğunluk DM+AH grubunda AH grubuna göre daha yüksektir.

Diyabetik hastalarda vasküler patolojilerin sık görüldüğü ve miyokardiyal iskemiye karşı gelişen anjiyogenik yanıtın bozulduğu anjiyografi (Abaci ve ark., 1999) ve otopsi çalışmaları (Yarom ve ark., 1992) ile gösterilmiştir. Bu bozukluğun nedenleri üç başlıkta toplanabilir: (1) Endotel ve vasküler düz kastaki bozulmalar (Caballero ve ark., 1999; Momose ve ark., 2002; Papaioannou ve ark., 2004; Rosen ve ark., 1996) (2) Hiperglisemiye uzun süreli maruziyetin ekstrasellüler proteinlerin disfonksiyonuna neden olarak yeni kan damarı oluşumunu engellemesi (Kuzuya ve ark., 1998; Tamarat ve ark., 2003) (3) Miyokardiyum özelinde büyüme faktörlerinde meydana gelen sinyalizasyon bozuklukları (Okashi ve ark., 2004; Sasso ve ark., 2005).

VEGF hem fizyolojik hem patolojik koşullarda hipoksi ile indüklenen anjiyogeneze ana düzenleyici konumundadır (Ferrara, 1997; Ferrara ve ark., 2003). Literatürde diyabetik miyokardiyumda VEGF düzeyleri ve damarlanma değişimi ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

STZ ile indüklenen Tip I diyabetin 12 aylık doğal seyrini inceleyen Yoon ve ark. (2005), na ait çalışma bu konudaki en uzun longitudinal çalışmadır. Araştırmacılar diyastolik fonksiyonun üçüncü aydan itibaren, sistolik disfonksiyona işaret eden fraksiyonel kısalma (FS) değerinin altıncı aydan itibaren bozulduğunu ve miyokardiyal kapiller dansitenin 6. aydan itibaren, miyokardiyal kan akımının ise 9. aydan sonra azaldığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada kardiyak VEGF ve VEGF-R protein düzeylerinde hem 2. hem 10. aydaki ölçümlerde azalma gösterdiği saptanmıştır. Buna paralel olarak EPC (Endothelial Progenitor Cell) sayıları 4, 8 ve 12. aylarda diyabetiklerde düşüş göstermiştir. Ek olarak, araştırmacılar fibrozis ile ilgili parametrelerin 8. aydan itibaren değişmeye başladığını rapor etmişlerdir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, diyabetik kardiyomiyopati patofizyolojisi zamansal bir dizgeye yerleştirildiğinde diyabetik kalpte görülen ilk patofizyolojik değişimin VEGF azalması olduğu, bunu EPC (Endothelial Progenitor Cell) apoptozisinin izlediği, bu noktada diyastolik disfonksiyonun tabloya eşlik ettiği, sürecin kapiller dansite azalması ve kardiyomiyosit apoptozisi ile devam ettiği, apoptoza uğrayan kardiyomiyositlerin yerini fibrotik dokunun alması ile birlikte sistolik

disfonksiyonun geliştiği anlaşılmaktadır. Aynı çalışmada diyabetik kalpte plazmid enjeksiyonu ile VEGF seviyelerinin artırılması, fonksiyon parametrelerinde düzelmeye ve kapiller yoğunlukta artışa neden olmuştur. VEGF tedavisi ile birlikte diyabette artan apoptozis ve fibrozisin de önüne geçilmiştir (Yoon ve ark., 2005).

Literatürde diyabette VEGF-kapillerite ilişkisini inceleyen ve diyabet süresi tez çalışmamıza kıyasla uzun olan çalışmaların sonuçları her ne kadar tez çalışmamız ile bire bir karşılaştırılabilir olmasa da diyabet sürecinde VEGF ve kapilleritenin değişimini ortaya koymaları açısından önemlidir. Lu ve ark. (2012), STZ ile indüklenen 12 haftalık Tip I DM modelinde sol ventrikül VEGF protein ve mRNA düzeyleri ile kapiller yoğunluğun diyabetiklerde düşük olduğunu ve eritropoietin uygulamasının tüm bu değişiklikleri restore ettiğini göstermişlerdir (Lu ve ark., 2012). Yang ve ark. (2012), STZ ile indüklenen 18 haftalık Tip I diyabetik farelerde sol ventrikül VEGF mRNA ekspresyon düzeyinin diyabet grubunda düşük olduğunu göstermişlerdir (Yang ve ark., 2012). Sasso ve ark. (2003), 90 günlük Tip I diyabetik ratlarda serum VEGF protein düzeyini ve kardiyak VEGF mRNA düzeylerini kontrol grubuna göre yüksek olduğunu saptamışlardır. VEGFR-1 ve VEGFR-2 mRNA düzeyleri açısından kontrol ve diyabet grupları arasında önemli bir fark olmadığını bildiren araştırmacılar, serum VEGF proteini ve kardiyak VEGF mRNA düzeyinde meydana gelen değişimi diyabetteki glikozile hemoglobin artışı ve nitrik oksit seviyelerinde meydana gelen azalma nedeniyle oluşan doku hipoksisine bağlamışlardır. Ayrıca diyabetiklerdeki artmış VEGF düzeyleri ile diyabetik kalpte damarlanmanın bozulması yönündeki literatür bilgisi arasındaki çelişki, kalpte oluşan VEGF direnci tezi ile açıklanmaya çalışılmıştır (Sasso ve ark., 2003). Xue ve ark. (2010), STZ ile indüklenen 90 günlük Tip I diyabetik farelerde sol ventrikül VEGF mRNA ve protein düzeyleri ile VEGFR-2 mRNA düzeyinin azaldığını, HIF molekülünü overeksprese eden transgenik diyabetik hayvanlarda bu azalmanın restore edildiğini rapor etmişlerdir. VEGF sinyal yolağındaki bu değişimlere paralel olarak, diyabetik hayvanlarda kalpte kapiller yoğunlukta meydana gelen azalma da HIF overekspresyonu ile düzelmiştir (Xue ve ark., 2010). Tez çalışmamızda diyabetik hayvanlarda VEGF protein düzeyi ve damarlanma değişikliği görülmemiş olmakla beraber, Xue ve ark. (2010) na ait çalışmada diyabet süresi (90 gün) tez

çalışmamızdaki yaklaşık 2 katıdır. Tez çalışmamızda diyabetik hayvanlarda VEGF ve damarlanmada aralıklı hipoksi ile sağlanan artışın ise tıpkı Xue ve ark. (2010), nın çalışmasında HIF overekspresyonu ile sağlanan etkiler gibi HIF indüksiyonu üzerinden gerçekleştiğini düşünmekteyiz. Bu noktada tez çalışmasında HIF verisinin bulunmaması ciddi bir limitasyon olarak karşımıza çıkmaktadır. Öte yandan Xue ve ark. (2010), HIF-1 α overekspresyonunun non-diyabetik kontrol farelerinde VEGF protein düzeyi ve kapiller yoğunlukta bir değişikliğe yol açmadığını bildirmişlerdir. Tez çalışmamızda ise aralıklı hipoksi uygulaması ile non-diyabetik ratlarda sol ventrikül VEGF düzeyinde meydana gelen artışa kapiller yoğunlukta bir artış eşlik etmemiştir. Xue ve ark. (2010)'nın bulgusuna kısmi uyum gösteren bu bulgudan, aralıklı hipoksi uygulaması ile HIF-1 α düzeyinde gerçekleşmesi beklenen olası artışın damarlanma artışına yansımayan bir VEGF düzey artışına neden olduğu anlaşılmaktadır.

Literatürde, tez çalışmamızın diyabet süresine yakın olmakla beraber sonuçları açısından çelişkili olan yayınlar da bulunmaktadır. Thirunavukkarasu ve ark. (2013), STZ ile indüklenen 30 günlük diyabette kardiyak VEGF protein düzeylerinin kontrole göre azaldığını göstermişlerdir (Thirunavukkarasu ve ark., 2013). Miyauchi ve ark. (2014), STZ ile indüklenen 4 haftalık diyabetik ratlarda kalp fonksiyonlarının bozulduğunu, sol ventrikül VEGF protein ve VEGFR-2 mRNA düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir (Miyauchi ve ark., 2014). Jesmin ve ark. (2007), 5 haftalık diyabetik dönemi takiben yaptıkları ölçümlerde sol ventrikül VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 mRNA ve protein seviyelerini diyabetik ratlarda kontrole göre önemli ölçüde düşük bulmuşlardır. Ek olarak araştırmacılar sol ventrikül kapiller yoğunluğunun da diyabet grubunda kontrole göre önemli oranda düşük olduğunu göstermişlerdir (Jesmin ve ark., 2007). Chou ve ark. (2002), STZ enjeksiyonu ile indüklenen 4 haftalık diyabetik hayvanlarda miyokardiyal VEGF₁₆₄, VEGF₁₈₈, VEGFR-1, VEGFR-2 mRNA ve plazma VEGF düzeylerinin önemli oranda azaldığını, kardiyak PECAM (damarlanma belirteci) ekspresyonunun ise değişmediğini, VEGF ve reseptörlerindeki değişimin insülin tedavisi ile normale döndüğünü, diyabetteki bu değişimden insülin eksikliğinin sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada kardiyak VEGF protein düzeyleri ölçülmemiştir (Chou

ve ark., 2002). Han ve ark. (2009), STZ enjeksiyonu ile oluşturdukları 5 haftalık Tip I diyabetik farelerde kontraktıl parametrelerde oluşan bozulmayı ekokardiyografik olarak göstermişlerdir. Bu bulguya paralel olarak diyabetik kalpte VEGF₁₆₄ ve VEGF₁₈₈ proteinleri ile kapiller yoğunlukta da azalma saptayan araştırmacılar, kapiller yoğunluk ile fraksiyonel kısalma arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönlü bir korelasyon bildirmişlerdir (Han ve ark., 2009). Yukarıda sözü edilen çalışmalaradaki VEGF proteini ve kapiller dansite sonuçları ile tez çalışmasının bulguları arasındaki uyumsuzluk açıklanmaya (tür farkı vs) muhtaçtır. Öte yandan Han ve ark. nın çalışmasındaki damarlanma-kontraktılite arasında gösterilen doğrudan ilişkili, tez çalışmamızda diyabetik hayvanlarda aralıklı hipoksi uygulaması ile kontraktılitede sağlanan düzelmenin damarlanma artışına bağlı olabileceğini destekler niteliktedir.

Literatürde VEGF'yi bir inflamasyon belirteci olarak kullanan ve diyabetik hayvanlarda serum VEGF değişimlerini inceleyen çalışmalara da rastlanmaktadır. Manna ve Sil (2012), STZ ile indüklenen 5 haftalık Tip I diyabetik ratlarda plazma VEGF düzeyinin diyabet grubunda kontrole göre artış gösterdiğini saptamışlardır. Kamper ve ark. (2010), aynı sonucu 1 haftalık diyabet süresinde bulgulamışlardır. VEGF'yi bir vasküler inflamasyon belirteci olarak tanımlayan araştırmacılar diyabetle birlikte vasküler inflamasyonun arttığı yönünde görüş bildirmişlerdir. Fonksiyon ve damarlanma bulgusu bulunmayan çalışmalarda doku VEGF düzeyleri de incelenmemiştir (Kamper ve ark., 2010; Manna ve Sil, 2012).

Literatürde tez çalışmamızdaki VEGF ve damarlanma bulgularına paralel sonuçlar içeren yayınlar da bulunmaktadır. Ma ve ark. (2006), 2 hafta ile 6 haftalık diyabet sürecini karşılaştırdıkları çalışmalarında sol ventrikül VEGF protein düzeyinin 2 haftalık diyabet uygulamasında kontrol grubuna kıyasla arttığını, 6. haftada ise düştüğünü, bu sonuca paralel olarak kapiller yoğunluğun da 2. haftada arttığını, 6. haftada ise kontrol grubuna göre farksız olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar iskemi-reperfüzyon (I/R) uygulaması ile 2. haftada infarkt alanının kontrole göre daha küçük olduğunu, 6. haftada ise diyabet ile kontrol grubu arasında fark olmadığını göstermişlerdir (Ma ve ark., 2006). Damarlanma sonuçları tez bulgusu ile

uyumlu olan çalışma, diyabette VEGF ve damarlanmada zamana bağımlı bir değişimin varlığını ve 6. haftadaki sonuçlar göz önüne alındığında VEGF ve damarlanma yanıtları arasında bir faz bulunabileceğini ortaya koymaktadır. Damarlanma artışının görüldüğü fazdaki I/R bulguları ise araştırmamızda aralıklı hipoksi uygulaması ile kontraktilitede gözlenen restorasyonun damarlanma artışı ile ilişkili olabileceğini destekler niteliktedir. Tuo ve ark. (2008), farelerde STZ uygulamasından 4 hafta sonra birçok anjiyogenik düzenleyici molekülü inceledikleri çalışmada, diyabetik farelerde sol ventrikülde damarlanma bozukluğuna işaret eder şekilde anjiyogenin-2'nin (Ang-2) ve Ang-2/Ang-1 oranının artışı, Tie-2'nin azalma gösterdiğini bildirmişlerdir. Sol ventrikül VEGF protein ekspresyonu açısından, kontrol ve diyabet grupları arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Ancak arter ligasyonu yöntemi ile hayvanlara iskemi protokolü uygulayan araştırmacılar VEGF'nin iskekiye verdiği cevabın diyabette önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir (Tuo ve ark., 2008). VEGF protein ekspresyonunun diyabetik grupta değişim göstermemesi tez çalışmamız ile paralellik göstermektedir. Çalışmanın diyabetik kalpte iskekiye verilen VEGF yanıtının bozulmasına ilişkin bulgusu hipoksi ile indüklenen HIF cevabının diyabette bozulması üzerinden tartışılmıştır. Tez çalışmamızda diyabetik dokuda hipoksi ile indüklenen VEGF yanıtının (non-diyabetik dokudakine göre) azalmış olmasının benzer bir mekanizma ile gerçekleştiği düşünülebilir. Bu çalışma ayrıca diyabetik dokuda anjiyogenin-2'nin düzenlenmesinde diğer anjiyogenik moleküllerin rolünü göstermesi açısından önemlidir.

Literatürde hipoksi uygulamasının VEGF ve/veya damarlanma cevabı üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalardan bazıları ise şu şekildedir: Zhong ve ark. (2002), 28 gün ve 42 günlük periyotlarda, Sprague-Dawley tipi sıçanlara günde 6 saat boyunca 5000 metreye eşdeğer hipoksi uyguladıkları çalışmada kapiller yoğunluğun hem sol hem de sağ ventrikülde artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Bazal kardiyak fonksiyonda bir değişim gözlemlenmeyen araştırmacılar I/R (30 dakika iskemi/60 dakika reperfüzyon) protokolünü takiben hipoksi grubunda kardiyoprotektif etki saptamışlardır (Zhong ve ark., 2002). Birot ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada 5500 metreye eşdeğer kronik hipobarik hipoksi protokolünü 1, 2, 4, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 25 gün boyunca uygulayarak, hipoksinin kalp üzerindeki etkilerini zamana bağımlı

incelemişlerdir. Kardiyak VEGF protein düzeylerinde fark gözlemlemeyen araştırmacılar, VEGF₁₈₈ mRNA düzeyinde 2. günde bir artış tespit etmiş, diğer günlerde bu artışın kaybolduğunu gözlemlemişlerdir. Ek olarak damarlanma parametrelerini de inceleyen araştırmacılar tez çalışmamızdakine benzer şekilde sol ventrikülde kapiller yoğunluk ve kapiller/kas lifi oranında değişim göstermemişlerdir (Biro ve ark., 2004). Cai ve ark. (2003), aralıklı hipoksi protokolü (5 döngü şeklinde 6 dakika %6 O₂ + 6 dakika % 21 O₂) uyguladıkları ve hipoksinin etkisini HIF molekülü üzerinden gösterdiği hipotezini test etmek amacıyla kardiyak HIF ekspresyonu düşük olan HIF-1 α ^{+/-} heterozigot fareler kullandıkları çalışmada; transgenik olmayan farelerde aralıklı hipoksi uygulamasının I/R protokolünü (30 dakika/120 dakika) takiben toparlanmada iyileşmeye neden olduğunu, HIF heterozigot farelerde bu iyileşmenin gerçekleşmediğini saptamışlardır. Benzer şekilde infarkt alanının aralıklı hipoksi uygulaması ile birlikte küçüldüğü, transgenik farelerde bu etkinin gözlenmediği bildirilmiştir. Çalışmada kardiyak GLUT 1 ve VEGF mRNA düzeyleri gruplar arasında fark bulunmamıştır (Cai ve ark., 2003).

Çizelge 4.1. Diyabet süresi ile VEGF ve damarlanma ilişkisi

Hafta	Diyabette VEGF ve damarlanmanın kontrole göre değişim yönü		
0	STZ Enjeksiyonu		
1	↑ (Kamper M. 2010)		
2	↑↑ (Ma G. 2006)		
4	↓ ↓ ↔ (Chou, 2002)	↓ (Miyauchi Y. 2014)	↔ (Tuo Q. 2008)
	↓ (Thirunavukkarasu M. 2013)		
5	↓ ↓ (Han B. 2009)	↑ (Manna P. 2012)	↓ ↓ ↓ (Jesmin S. 2007)
6	Tez Çalışmamız	↓ ↔ (Ma G. 2006)	↔ ↔ (Yoon Y. 2005)
8	↓ (Yoon Y. 2005)		
12	↓ ↓ ↓ (Xue W. 2010)	↑ ↑ (Sasso FC. 2003)	↓ ↓ ↓ (Lu J. 2012)
18	↓ (Yang B. 2012)		
24	↓ (Yoon Y. 2005)		
40	↓ (Yoon Y. 2005)		
■ Kardiyak VEGF protein düzeyi ■ Serum/plazma VEGF düzeyi ■ Kardiyak VEGF mRNA düzeyi ■ Sol ventrikül kapiller yoğunluğu			

Tez çalışmamızda Tip I diyabette kalp fonksiyonlarında gözlenen bozukluğa VEGF ve damarlanmada bir bozulmanın eşlik etmediği anlaşılmaktadır. Literatürde 6 hafta ve daha kısa süreli diyabette VEGF düzeyi ve damarlanmanın azaldığını gösteren çalışmalar olmakla birlikte diyabetin anjiyogenik homeostazisi etkilemesi için daha uzun süreye ihtiyaç olduğunu ortaya koyan çalışmalar da mevcuttur (Tablo 4.1’de özetlenmiştir). Buradan hareketle diyabette anjiyogenik mekanizmanın bozulduğu konusundaki mevcut fikir birliğinin bu bozulmanın başlangıç zamanı ile ilgili olarak bulunmadığı anlaşılmaktadır. Ayrıca VEGF protein artışının damarlanma cevabına dönüşümü arasında bir faz olduğu Ma ve ark. (2006), çalışmasında gösterilmiştir. Tez çalışmamızın sonuçları, uyguladığımız Tip I DM modelinin süresinin anjiyogenik homeostazisi bozmaya yeterli olmadığını, dolayısıyla diyabetik kalpte görülen fonksiyon bozukluğunun VEGF-damarlanma yanıtından önce ve bağımsız olarak geliştiğini ve diyabette görülen sol ventrikül fonksiyon bozulmasının damarlanma üzerinden açıklanamayacağını ortaya koymaktadır.

Fizyolojik hipertrofide VEGF nin indüklenmesiyle hipertrofiye damarlanma artışı eşlik etmekte, patolojik hipertrofide ise artan kas kitlesine yeterli damarlanma artışı eşlik etmediği için kalp yetmezliği oluşmaktadır (Xue ve ark., 2010) Tez çalışmamızda aralıklı hipoksi uygulamasının diyabetik hayvanlarda kalp fonksiyon bozukluğunda restorasyona neden olduğu, bu restorasyona VEGF ve damarlanma düzeylerinde bir artışın eşlik ettiği görülmüştür. Kontraktilite ile VEGF-damarlanma arasında gösterilmiş olan korelasyon dikkate alındığında (Han ve ark., 2009) fonksiyonel parametrelerde elde edilen düzelmenin VEGF-damarlanma artışı ile ilişkili olduğu ileri sürülebilir. Miyokardiyum kesintisiz enerji ve oksijen ihtiyacı olan dokuların başında gelir. Kalbin ana enerji kaynağı (%60-70) yağ asitlerinin β -oksidasyonu sonucu ortaya çıkan ATP’dir (Neubauer, 2007). İnsülin varlığı substrat kullanımını glukoz lehine değiştirir, yağ asitlerinin kullanımı %20’lere kadar düşer. Ayrıca çeşitli stres durumlarında da (örn. hipoksi, patolojik hipertrofi, kalp yetmezliği) bir savunma mekanizması olarak substrat tercihi glukoz yönünde kayar. Bir molekül yağ asidinin yıkımı glukozu göre daha fazla ATP açığa çıkarmakla birlikte, β -oksidasyon işleminde kullanılan oksijen glikolitik yola kıyasla daha fazladır. Dokuda birim ATP üretimi için gereken oksijen miktarı, glukoz yıkımı ile

üretildiğinde yağ asidi oksidasyonuna göre %12 daha azdır (Bertrand ve ark., 2008). Diyabette miyokardiyal substrat kullanımı önemli ölçüde değişmekte ve glukoz metabolizmasında meydana gelen bozulma miyokardın yağ asitlerine talebini önemli ölçüde arttırmaktadır (Patterson ve ark., 2009). Bu değişim miyokardiyal oksijen tüketimini önemli ölçüde arttırmakta ve kalbin verimini düşürmektedir. Kontraktil performansdaki azalmanın oksijen talebi ile oksijen arzı arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak gerçekleşmesi mümkündür. Aralıklı hipoksi uygulaması ile damarlanmada sağlanan artış, fazladan oksijen talebi bulunan dokuya oksijen arzını arttırmış ve bu yolla miyokardiyal kontraktiliteyi restore etmiş olabilir.

4.4.Sol Ventrikül PHD Düzeyleri:

Çalışmamızda Western Blot yöntemi ile saptanan sol ventrikül PHD2 ve PHD3 protein düzeyi sonuçlarına göre:

- 1) PHD2 düzeyi DM+AH grubunda K ve AH gruplarına göre önemli ölçüde düşük bulunmuştur. DM grubu ile DM-AH grubu arasında ise fark gözlenmemiştir.
- 2) PHD3 düzeyi DM+AH grubunda diğer üç gruba göre (K, AH ve DM) önemli ölçüde düşüktür.
- 3) PHD2 ve PHD3 düzeyleri açısından K & DM ve K & AH grupları arasında önemli bir fark saptanmamıştır.

PHD'ler moleküler oksijeni kofaktör olarak kullanan, oksijen varlığında HIF-1 α molekülünü degrade eden enzim yapılı moleküllerdir. Hipoksi durumunda PHD'nin katalitik aktivitesi hipoksinin şiddeti ile doğru orantılı olarak azalma gösterir. Degradasyondan kurtulan HIF-1 α , HIF-1 β ile birleşerek genomdaki HRE (Hypoxia Response Element) bölgelerine bağlanır ve protein transkripsiyonunu regüle eder. Bu özelliklerinden ötürü PHD'ler hücrede adeta bir "oksijen sensörü" olarak görev yaparlar. Son yıllarda hipoksinin etkileri ile ilgili yapılan araştırmalar PHD'lerin HIF regülasyonundaki kritik rolünü giderek daha fazla öne çıkarmaktadır (Katschinski, 2009; Rabinowitz, 2013). Kalpte; normoksi durumunda en yoğun bulunan PHD

izoformu PHD2'dir. Ancak PHD3 doku hipoksisinden daha fazla etkilenmektedir (Willam ve ark., 2006). HIF-1 α molekülüne olan affiniteleri açısından bakıldığında PHD2'nin PHD3'ten daha yüksek affiniteye sahip olduğunu söyleyen çalışmalar (Huang ark., 2002) olduğu gibi affinitelerini eşit bulan çalışmalar da mevcuttur (Tuckerman, 2004).

Literatürde PHD'ler tarafından regüle edilen HIF molekülünün diyabette azaldığı, diyabetik dokuda hipoksiye verilen HIF yanıtının bozulduğu ve bu değişimlerin diyabetik kardiyomiyopatinin patogenezinde önemli bir yer tuttuğuna dair çok sayıda yayına rastlamak mümkündür (Bento ve ark., 2011; Catrina, 2014; Xiao H ve ark., 2013). Bu nedenle diyabette kardiyak dokuda HIF stabilizasyonunun artırılması önemli bir kardiyoproteksiyon stratejisi olarak kabul görmektedir. Kido ve ark. (2005), transgenik fareler ile yaptıkları çalışmada, HIF-1 α overekspresyonu olan grupta MI (miyokard infarktüsü) sonrası infarkt alanın kontrol grubuna göre önemli ölçüde küçüldüğünü; MI'ı takip eden 4. haftada kalp fonksiyonlarının kontrole göre önemli düzeyde iyileşme gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu verilere ek olarak araştırmacılar, HIF-1 α overekspresyonuyla infarkt ve peri-infarkt alanda kapiller yoğunluğu ile VEGF ve NOS düzeylerinin önemli düzeyde arttığını saptamışlardır (Kido ve ark., 2005). Xue ve ark. (2010), diyabetin neden olduğu yapısal ve biyokimyasal bozuklukların HIF-1 α overekspresyonu ile önlendiğini göstermişlerdir (Xue ve ark., 2010).

HIF stabilizasyonu için CoCl₂, DMOG (dimetilglioksal), GSK360A gibi PHD inhibitörleri yanında, PHD gen ifadesinin susturulması (silencing) ve hipoksi uygulaması gibi çeşitli PHD merkezli yöntemler de kullanılmaktadır. Xi ve ark. (2004), I/R uygulamasını takiben miyokardiyal infarkt alanının CoCl₂ uygulanan grupta küçüldüğünü ancak post-iskemik kardiyak fonksiyonunun değişmediğini bildirmişlerdir (Xi ve ark., 2004). Ockaili ve ark. (2005), DMOG uygulaması ile yaptıkları PHD inhibisyonu sonucunda miyokardiyal infarkt alanında küçülme ve antiinflamatuvar etki göstermişlerdir (Ockaili ve ark., 2005) Bao ve ark. (2010), GSK360A isimli PHD inhibitörünün iskemi/reperfüzyon sonrasındaki toparlanma

cevabında iyileşmeye neden olduğunu, infarkt alanını küçülttüğünü ve infarkt alanındaki damarlanmayı arttırdığını göstermişlerdir (Bao ve ark., 2010).

Cai ve ark. (2003), çalışmalarında aralıklı hipoksinin iskemi/reperfüzyon sonrası toparlanma cevabında artışa neden olduğunu göstermiş ve HIF-KO ratlarda bu etkinin görülmemesinden yola çıkarak aralıklı hipoksinin kardiyoprotektif etkisini HIF molekülü üzerinden gerçekleştirdiğini öne sürmüşlerdir (Cai ve ark., 2003). Tez çalışmamızdaki aralıklı hipoksi uygulamasının temel amacı da Cai ve ark. (2003), çalışmasında olduğu gibi diyabetik kalpte HIF stabilizasyonunun arttırılmasına yöneliktir. Çalışmamızda, HIF düzeyleri ile ilgili veriye sahip olmamakla birlikte, diyabetik hayvanlarda PHD2 ve PHD3 (önemli düzeyde) düzeylerinin aralıklı hipoksi uygulaması ile azaldığı, beraberinde VEGF düzeylerinin ve damar yoğunluğunun artış gösterdiği saptanmıştır. Literatür bilgisi ışığında bu sonuçlar, diyabetik kalpte sol ventrikül fonksiyonunda görülen iyileşmeden HIF stabilizasyon artışına bağlı olarak VEGF sinyalinde ve damarlanma yanıtında meydana gelen değişimin sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

Diyabette PHD düzeylerini inceleyen az sayıda çalışma mevcuttur. Tip I diyabette PHD düzeylerini inceleyen tek çalışma Thirunavukkarasu ve ark. (2016), tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmadaki tüm gruplara miyokard infarktüsü (Mİ) protokolünün uygulandığı ve PHD protein düzeylerinin Mİ uygulamasından sonra gruplar arasında karşılaştırıldığı bu çalışmada bazal PHD değerlerine dair bir veri bulunmamaktadır. Xia ve ark. (2015), 4 haftalık yüksek yağlı diyetin ardından düşük doz STZ enjeksiyonu ile tip II diyabet modeli oluşturdıkları ve 12 haftalık diyabetin yol açtığı zararlı etkileri PHD3 geninin susturulması (silencing) yoluyla önlemeye çalıştıkları araştırmalarında, diyabetik ratlarda sol ventrikül PHD3 düzeylerinin kontrole göre önemli düzeyde yüksek olduğunu saptamışlardır. Çalışmada 12 haftalık diyabetin kalp fonksiyonlarında bozulmaya, apoptozis ve fibroziste artışa neden olduğu görülmüş; PHD3'ün susturulması diyabetin neden olduğu tüm bu bozukluklarda restorasyona yol açmıştır. Sonuçlar, PHD3 inhibisyonunun kardiyoprotektif etkisine işaret etmektedir. Araştırmacılar ayrıca HIF-1 α 'nın diyabetik ratlarda azalma gösterdiğini, PHD3'ün susturulmasıyla HIF-1 α düzeyinin

kontrol değerlerine döndüğünü de bildirmişlerdir. Ek olarak, H9c2 kardiyomiyoblast hücreleri ile yaptıkları çalışmada kültür ortamının hiperglisemik hale getirilmesinin ROS üretimini ve PHD3 ekspresyonunu arttırdığını; antioksidan etkinliği bilinen N-Asetilsistein maddesinin kültür ortamına eklenmesi ile birlikte hem ROS hem de PHD3 ekspresyonunda azalma gerçekleştiğini bildirmişlerdir (Xia ve ark., 2015). Diyabetik kalpteki PHD3 bulgusu tez çalışmamız ile uyumlu olmamakla birlikte çalışmanın PHD3 inhibisyonu ile elde edilen sonuçları, tez çalışmamızda diyabetik ratlarda aralıklı hipoksi uygulaması ile kalp fonksiyonlarında gözlenen restorasyonun PHD düzeylerinde saptanan azalmaya bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Öte yandan aralıklı hipoksi uygulamasının PHD ekspresyonu ile birlikte oksidatif stresi de azaltmış olması, Xia ve ark. (2015)'nin PHD3'ün ROS tarafından regüle edildiğini gösteren bulgularıyla uyumludur. Çalışmamız tip I diyabetin ve aralıklı hipoksinin kalp PHD düzeyleri üzerindeki etkisini inceleyen ilk çalışma olması bağlamında özgünlük taşımaktadır.

4.5. Sol Ventrikül MMP Düzeyleri

Tez çalışmamızın sol ventrikül MMP-2 ve MMP-9 düzeylerine ilişkin istatistiksel değerlendirmesine göre:

- 1) Diyabet grubunda kardiyak MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli oranda düşük olduğu tespit edilmiştir.
- 2) Aralıklı hipoksi diyabetik kalpte MMP-2 ve MMP-9 düzeylerindeki azalmayı önlemiş, proteinlerin kontrol seviyesinde kalmasını sağlamıştır.
- 3) Kontrol ve aralıklı hipoksi grupları arasında MMP-2 ve MMP-9 açısından istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamıştır.

MMP'ler, özellikle MMP-2 ve MMP-9, tarafından gerçekleştirilen ekstrasellüler matriks degradasyonunda meydana gelen regülasyon bozukluğu ateroskleroz, konjestif kalp yetmezliği, miyokard infarktüsü ve kardiyomiyopati gibi birçok kardiyovasküler patolojinin altında yatan nedenler arasında yer alır (Amalinei ve

ark., 2007). Ekstrasellüler matriks sadece hücreleri saran bir destek yapı olarak değil aynı zamanda kardiyak remodelling'i kontrol eden dinamik bir sistemdir. Kardiyak remodelling, ekstrasellüler matriksin sentez ve degradasyonunu içeren bir süreçtir ve bu süreç MMP'ler ve onların endojen inhibitörleri olan TIMPs (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases) molekülleri tarafından regüle edilir. MMP/TIMP dengesindeki değişim birçok kardiyak patoloji için önemli bir göstergedir (Hopps ve Caimi, 2015).

Diyabetik kardiyomiyopati ile ilgili çalışmalar, ekstrasellüler matriksteki ana bileşenler olan miyokardiyal kollajen tip I, III ve VI'nın kalp dokusunda biriktiğini, intersitisyel ve perivasküler fibrozise yol açtığını ve bu birikimin sol ventrikül sistolik ve diyastolik fonksiyon bozuklukları ile korelasyon gösterdiğini bildirmektedir (Tschope ve ark., 2004). Diyabetik kardiyomiyopatide görülen fibrozisin diyabetik kalpte MMP-2 ekspresyon/aktivitesinde meydana gelen azalma ile ilişkili olduğu gösterilmiş olmakla birlikte MMP-9 ile ilgili sonuçlar çelişkilidir. (Linthout ve ark., 2008).

Bollano ve ark. (2007), 12 haftalık tip I diyabetik ratlarda sol ventrikül MMP-2 protein düzeyinin diyabetik kalpte önemli düzeyde azalmış ve miyokardiyal kollajen miktarının önemli düzeyde artmış olduğunu bildirmişlerdir. Kardiyak hipertrofiyi gösteren kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranının da diyabet grubunda önemli ölçüde yüksek olduğu saptanmıştır. Tüm bu fibrotik değişimlere sol ventrikül fonksiyon bozukluğu da eşlik etmiştir (Bollano ve ark., 2007). Tez çalışmamızda diyabetik kalpte hipertrofi gözlenmemiş olmakla birlikte, MMP-2 bulgumuz Bollano ve ark. (2007), nın bulgusu ile uyumludur. Tez çalışmamızdaki 6 haftalık diyabet süresinin MMP düzeyleri ve kalp fonksiyonu üzerinde etkili olmasına karşın, kalp ağırlığına yansiyacak düzeyde bir yapısal değişiklik için yeterli olmadığı ileri sürülebilir.

Li ve ark. (2007), 4 haftalık tip I diyabetik ratlarda serum MMP-2 ve TIMP-2 düzeylerini incelemiş, serum MMP-2 düzeyinin değişmediğini, serum TIMP-2 düzeyinin ise diyabetik grupta artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Kalp dokusunda ise, MMP-2 mRNA düzeyi ve MMP-2 aktivitesini diyabetik grupta azalmış bulurken;

TIMP-2 mRNA ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Araştırmacılar ek olarak yaptıkları immünohistokimyasal incelemede, diyabetik dokuda kardiyomiyositlerin ve damarların etrafında kollajen birikimi gerçekleştiğini, MMP-2/TIMP-2 oranı ile kollajen miktarı arasında negatif yönlü bir korelasyon bulunduğunu bildirmişlerdir (Li ve ark., 2007).

Linthout ve ark. (2008), tip I diyabet modelinde farklı diyabet sürelerinde ortaya çıkan etkileri inceledikleri çalışmada, 2 haftalık diyabette miyokardiyal kollajen birikiminde fark bulamazken, 6 haftalık diyabette tip I ve tip III kollajen birikiminin arttığını saptamışlardır. Sol ventrikül MMP-9 ve MMP-2 mRNA düzeylerini inceleyen araştırmacılar MMP-2 mRNA'sının 2. ve 6. haftalarda kontrol grubuna göre önemli derecede düşük olduğunu, MMP-9 mRNA'sında ise değişiklik olmadığını bulmuşlardır. Ek olarak MMP-2 aktivitesinde bir düşüş gözlemlenirken, MMP'leri inhibe ettiği bilinen TIMP-2 protein ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca zimojen formunda salgılanan MMP'leri proteolitik olarak aktive eden MMP-14 enziminde diyabetle birlikte aktivite azalması göstermişlerdir. Makalede MMP/ TIMP dengesindeki değişim kalpteki kollajen birikiminden sorumlu tutulmuştur (Linthout ve ark., 2008).

Li ve ark. (2007), ile Linthout ve ark. (2008), nın çalışmalarına ait bulgular tez çalışmamızın MMP bulgularının açıklanmasında önemli ipuçları ortaya koymaktadır. Bu iki çalışmadan elde edilen bulgular ışığında, tez çalışmamızdaki MMP-2 protein düzeyinde saptanan azalmanın transkripsiyonel kaynaklı olduğu ileri sürülebilir. Öte yandan, çalışmamızda kollajen miktarı incelenmemiş olmakla birlikte MMP-2 aktivitesi ve kollajen birikimi arasında saptanan korelasyon göz önüne alındığında, tez çalışmamızda da 6 haftalık diyabetin kalpte fibrozis gelişimine neden olmuş olması beklenir. Kardiyak fibrozis sol ventrikül duvar sertliğine ve ventriküler duvar kompliyansında azalmaya yol açarak hem sistolik hem de diyastolik disfonksiyonun gelişimine katkı koyar. Diyabetik hayvanlara uygulanan aralıklı hipoksinin MMP-2 ve MMP-9 protein ekspresyonlarında neden olduğu düzelmeye kollajen birikimini azalttığı ve bu antifibrotik etkinin DM+AH grubunda gözlenen fonksiyonel iyileşmenin altında yatan nedenlerden biri olabileceğini düşünmekteyiz.

Zeydanlı ve Turan (2009), STZ enjeksiyonu ile oluşturulan 4 haftalık tip I diyabet modelinde rat aortasında vasküler yanıtlarda bozulma, MMP-2 ve MMP-9 protein seviyelerinde değişim olmaksızın enzim aktivitelerinde kontrole göre düzeyinde önemli bir azalma ve TIMP-4 seviyesinde önemli bir artış göstermişler, diyabetik rat aortasında meydana gelen bu değişimleri diyabetik dokudaki oksidan stresle ilişkilendirmişlerdir. Araştırmacılar ek olarak antioksidan etkili Omega-3E uygulamasının diyabetik aortada vasküler yanıtları düzelttiğini ve enzim aktivitelerini regüle ettiğini göstermişlerdir (Zeydanlı ve Turan, 2009). Antioksidan selenyum uygulaması ile de benzer sonuçlara ulaşan araştırmacılar, (Zeydanlı ve ark., 2010) selenyum ve Omega-3E'nin antioksidan etkiye ek olarak MMP aktivasyonunda regülasyona neden olarak da etkili olabileceklerini ileri sürmüşlerdir. Taye ve ark. (2013), da tip I diyabetik ratlarda antioksidan etkinliği bilinen tempol maddesini uygulayarak ROS'un MMP regülasyonunda önemli bir yere sahip olduğunu ortaya koyan bulgulara ulaşmışlardır (Taye ve ark., 2013). Tez çalışmamızda benzer şekilde diyabetik kalpte gözlenen MMP downregülasyonunun redoks statusunda meydana gelen bozulma ile ilişkili olduğunu ve aralıklı hipoksinin redoks statusunu düzelterek MMP düzeylerini normalize ettiğini; MMP aktivasyonundaki regülasyonun fibroziste sağladığı iyileşme ile diyabetik kalpte fonksiyon bozulmasını önlediğini iddia etmekteyiz.

Yaras ve ark. (2008), STZ ile oluşturulan 4 haftalık tip I diyabetin kalp dokusunda yol açtığı mekanik ve elektriksel değişikliklere ek olarak kardiyak MMP-2 aktivite ve protein düzeyleri ile troponin I düzeyinde azalma göstermişlerdir. Araştırmacılar potent bir MMP inhibitörü olan doksisiklin uygulaması ile MMP-2 ve troponin I düzeylerinde diyabetin indüklediği değişikliklerin kontrol düzeylerine döndüğünü ve doksisiklinin diyabetik kalpteki mekanik fonksiyon bozukluğunu (hiperglisemide bir düzelme sağlamaksızın) Ca^{2+} homeostazisi ile ilgili parametreleri düzeltmek suretiyle restore ettiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar diyabete bağlı kalp fonksiyon bozukluğundan kısmen, oksidatif stres ile aktive olan MMP'lerin sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir (Yaras ve ark., 2008). Tez çalışmamızdaki diyabet grubuna ait MMP düzeyleri ve redoks statusu ile ilgili bulgular sözü edilen çalışma ile uyumludur. Yaras ve ark. nın çalışmasına benzer şekilde, MMP düzeylerindeki

azalma diyabet grubunda redoks statusunda görülen bozulma ile birlikte ve oksidatif stresle ilişkili görünmektedir. Yine tez çalışmamızda aralıklı hipoksinin doksisiklin'in etkisine benzer şekilde MMP düzeylerini restore ettiği dikkate alındığında aralıklı hipoksi ile kalp fonksiyonunda meydana gelen düzelmeden MMP düzeylerinde meydana gelen normalizasyonun sorumlu tutulması akla uygundur. Aralıklı hipoksinin MMP düzeylerinde sağladığı normalizasyon, redoks statusu üzerindeki iyileştirici etkisi ile ilişkili gözükmemektedir. Öte yandan, MMP'lerin diyabetik kalbin mekanik fonksiyonu üzerindeki olumlu etkisi, fibrozisi iyileştirmesi yanında Yaras ve ark. (2008), nın iddia ettiği gibi hücrel kalsiyum homeostazisi üzerindeki etkileri ile de ilişkili olabilir.

Ayrıca, MMP'lerin anjiyogenezis sürecinde etkili olduğu bilinmektedir. MMP'lerin birçok alt tipinin degrade ettiği Tip I kollajen, perivasküler alandaki en önemli yapıtaşlarından biridir. MMP'lerin dolayısıyla kollajen yıkımının baskılanmasının kapiller oluşumunu inhibe ettiği Tarabolletti ve ark. (1995), tarafından gösterilmiştir (Tarabolletti ve ark., 1995). Qian ve ark. (1997), trombospandin-1'in (TSP-1) anjiyogenik süreçlere etkilerini inceledikleri çalışmalarında, TSP-1'in düşük konsantrasyonlarda kapiller oluşumunu indükleyici, yüksek konsantrasyonlarda ise baskılayıcı yönde etki ettiğini göstermişlerdir. Etkilerini MMP-9 regülasyonu üzerinden gösteren TSP-1, anjiyogenezis için optimal MMP-9 aktivitesini düşük konsantrasyonlarda sağlayabilmekte, yüksek konsantrasyonlarda ise aşırı MMP-9 aktivitesi nedeni ile damar oluşumunu engellemektedir (Qian ve ark., 1997). MMP-2 ve MMP-9'un anjiyogenezis sürecindeki etkileri ile ilgili başka çalışmalara da rastlamak mümkündür. Braunhut ve Moses (1994), HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) hücreleri ile yaptıkları çalışmada, kültür ortamına eklenen TIMP-1 ve TIMP-2'nin kapiller oluşumunu engellediğini bildirilmişlerdir (Braunhut ve Moses, 1994). Itoh ve ark. (1998), MMP-2 KO farelerde, tümöral anjiyogenezin azaldığı göstermişlerdir (Itoh ve ark., 1998).

Tez çalışmamızda, diyabette MMP-2 ve MMP-9 protein düzeylerinde görülen düşüşü aralıklı hipoksi uygulaması önlemiştir. Literatürde aralıklı hipoksi

uygulamasının diyabette MMP/TIMP dengesi ve fibrozis üzerinde etkisini inceleyen az sayıda yayına rastlanmaktadır.

Faramoushi ve ark. (2016), yüksek yağlı diyeti takiben düşük doz STZ enjeksiyonu ile oluşturdukları 8 haftalık tip II diyabet modelinde koruyucu unsur olarak 3400 metreye denk kronik aralıklı hipoksi protokolü uygulamışlardır. Diyabetik ratlarda sol ventrikülde kollajen düzeylerinin arttığını gösteren araştırmacılar bu artışın aralıklı hipoksi uygulaması ile restore edildiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, tez çalışmamıza oldukça yakın bir aralıklı hipoksi protokolünün antifibrotik etkisini göstermesi açısından önemlidir. Araştırmacılar ek olarak diyabetik hayvanlara uygulanan kronik aralıklı hipoksinin kan şekeri, trigliserit ve HOMA-indeksi düzeylerinde önemli oranda bir restorasyona neden olduğunu saptamışlardır. Çalışmanın kan şekeri bulgusunun tez çalışmamızla uyumluluk göstermemesi diyabet modelinin farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Tez çalışmamızda miyokardiyal fibrozis üzerinde doğrudan bir inceleme bulunmamakla birlikte, aralıklı hipoksi uygulamasının hiperglisemi üzerinde etkili olmadığı bulgusu, aralıklı hipoksinin biyokimyasal süreçlerden bağımsız olarak da antifibrotik etki gösterebildiğine işaret etmektedir (Faramoushi ve ark., 2016).

Öte yandan, aralıklı hipoksinin etkilerinden büyük ölçüde sorumlu olan HIF molekülü ile MMP'ler ve fibrozis arasında ilişki kuran çalışmalara da rastlamak mümkündür. Xue ve ark. (2010), 90 günlük tip I diyabet modelinde kardiyak fibrozis oluşumunu gösterdikleri çalışmalarında HIF overekspresyonu ile fibrotik etkinin azaldığını bildirmişlerdir. Çalışmada MMP düzeyleri incelenmemiş ve antifibrotik etkiyle ilişkili olarak MMP'lerin rolü tartışılmamıştır. (Xue ve ark., 2010). Öte yandan MMP-2 ve MMP-9'un HIF'in hedef genleri arasında olduğu bilinmektedir. HIF stabilizasyonunda sağlanan artışın MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir (Hong ve ark., 2004; Luo ve ark., 2006; O'Toole ve ark., 2008, Tsai ve ark., 2016). Dolayısıyla MMP regülasyonu üzerinde redoks statusu ile birlikte HIF sinyal yolağının da etkili olduğu açıktır. Milkiewicz ve Haas (2005), mekanik gerimin iskelet kasları üzerindeki anjiyogenik etkisini inceledikleri çalışmada da, mekanik gerim ile birlikte artan anjiyogenezin HIF-1 α mRNA ve

MMP-2 mRNA düzeylerindeki artıştan kaynaklandığını göstermişlerdir (Milkiewicz ve Haas, 2005).

Tez çalışmamızda diyabetin kalp dokusunda MMP-2 ve MMP-9 düzeylerini azalttığı, aralıklı hipoksi uygulamasının bu azalmayı önlediği ortaya konmuştur. MMP'lerin aktivasyonunun düzenlenmesinde ROS'un rolü ve MMP-2 ile MMP-9'un HIF'in hedef genleri arasında olduğu birlikte göz önüne alındığında, aralıklı hipoksinin hem redoks statusunu düzelterek hem de HIF stabilizasyonunu arttırarak MMP düzeylerini normalize ettiği düşünülebilir. MMP'lerin kardiyak remodelling yanında kardiyak kontraktilite ve anjiyogenezis süreçlerindeki regüle edici etkileri dikkate alındığında, aralıklı hipoksinin HIF stabilizasyonunda neden olduğu artışa ek olarak MMP upregülasyonuna da yol açarak diyabetik kalpteki fonksiyonel düzelmeye katkıda bulunduğu ileri sürülebilir.

4.6. Serum ve Miyokardiyal Redoks Statusu:

Çalışmamızda serumda ve kalp dokusunda total oksidan status (TOS) ve total antioksidan status (TAS) ölçümleri yapılmış, bu veriler kullanılarak oksidatif stres indeksi (OSİ) değerleri hesaplanmıştır:

- 1) Serum TOS, TAS ve OSİ değerleri açısından gruplar arasında önemli bir fark saptanmamıştır.
- 2) Miyokardiyal TAS değeri gruplar arasında farksız bulunmakla birlikte, TOS ve OSİ değerlerinin diyabet grubunda yüksek olduğu, aralıklı hipoksi uygulaması ile bu artışın kontrol seviyelerine döndüğü gösterilmiştir. K ve AH grupları arasında ise önemli bir fark bulunmamıştır.

Reaktif oksijen türevleri (ROS); hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit ($\bullet O_2^-$) ve hidroksil ($\bullet OH$) radikalleri, peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi oksidatif strese yol açma potansiyeline sahip molekülleri tanımlar. ROS çeşitli fizyolojik süreçler sonucunda sitosol ve mitokondride yerleşim gösteren dört farklı enzim sistemi tarafından

üretir: Mitokondriyal elektron transport zinciri, NADPH oksidaz (NOX), ksantin oksidaz (XO) ve endotelyal NOS (eNOS). Normal şartlarda süperoksit dismutaz (SOD), hemoksjenaz-1 (HO-1), redükte glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) gibi enzimatik, transferin, ferritin, vitamin A, vitamin E ve vitamin C gibi non-enzimatik antioksidan savunma sistemleri tarafından zararlı etkileri dengelenen ROS üretiminin antioksidan savunma sistemlerinin tamponlama kapasitesini aşması “oksidatif stres” olarak tanımlanır (Flippo ve ark., 2006; Lorenzo ve ark., 2013). Tez çalışmamızda yapılan TAS ve TOS ölçümleri ile doku oksidan ve antioksidan bileşenlerini ayrı ayrı incelemek yerine toplam potansiyel kapasitenin ölçülmesi hedeflenmiştir.

Mitokondri ve/veya sitosol kaynaklı reaktif oksijen türevlerinin artışı diyabetik kardiyomiyopati gelişiminde önemli bir role sahiptir (Yılmaz ve ark., 2015). Tuncay ve ark. (2013), STZ ile indüklenen Tip I DM oluşturdıkları Wistar cinsi sıçanlarla yaptıkları çalışmada 12 haftalık diyabeti takiben yaptıkları ölçümlerde plazmada ve sol ventrikül homojenizatlarında TOS değerlerinin arttığını, TAS değerlerinin ise azalma gösterdiğini saptamışlardır (Tuncay ve ark., 2013). Yıldırım ve ark. (2013), benzer şekilde STZ ile indüklenen Tip I DM oluşturdıkları Wistar cinsi sıçanlarla yaptıkları çalışmada 5 haftalık diyabeti takiben hem plazmada hem kalpte TOS değerlerinin arttığını, TAS değerlerinin azaldığını bildirmişlerdir (Yıldırım ve ark., 2013).

Diyabette, glukoz metabolizmasında meydana gelen bozulmanın yol açtığı hiperglisemi hemen tüm hücre tiplerinde ROS üretimini arttıran bir etkiye sahiptir (Asrih ve Steffens, 2013; Brownlee ve ark., 2005). Ayrıca yüksek glukoz konsantrasyonu AGEs (Advanced Glycation Endproducts) oluşumunu da artırır. AGEs, kendisine özgü reseptörlerine (RAGE) bağlanarak NOX aktivasyonuna ve daha fazla ROS üretime sebep olur (Goldin ve ark., 2006). Maalouf ve ark. (2012), NOX4'ün sol ventrikül için önemli bir ROS kaynağı olduğunu ve NOX4 kaynaklı ROS'un tip I diyabetin erken safhalarında kardiyomiyopati oluşumunda rol oynadığını bildirmişlerdir (Maalouf ve ark., 2012). Ek olarak, Ceriello (2005), yüksek glukozu akut maruziyetin iNOS gen ekspresyonunu arttırarak •NO, •O₂⁻ ve

ONOO⁻ radikallerinin oluşumunu tetiklediğini göstermiştir (Ceriello, 2005). Reaktif oksijen türevleri, bir DNA tamir enzimi olan PARP (poli-ADP riboz-polimeraz-1 enzimi) artışına neden olur. PARP koruyucu etkileri yanında GAPDH (gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) enzimini inhibe ederek glikolitik ara ürün birikimine ve dolayısıyla AGEs oluşumuna neden olmaktadır (Chiu ve ark., 2008; Seddon ve ark., 2007). Yüksek glukoz konsantrasyonu ayrıca heksozamin biyosentez yolağına olan substrat akışını hızlandırarak ROS üretimi ve insülin direnci ile ilişkili olduğu bilinen N-asetilglukozamin maddesinin artışına neden olur (Rajamani ve Essop, 2010). Diyabette artan yağ asidi kullanımının da mitokondriyal ROS üretimini arttırdığı bildirilmiştir (Boudina ve Abel, 2010).

Redoks statusundaki değişikliklerin diyabetik kardiyomiyopati patogeneğinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Reaktif oksijen türevleri proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi hücre fonksiyonları için kritik molekülleri okside ederek hücrede hasar oluşuma neden olur. Aşırı ROS üretimi ile kardiyak hipertrofi, fibrozis, kontraktıl disfonksiyon ve kalp yetmezliği arasında ilişki olduğu bilinmektedir (Seddon ve ark., 2007). Ek olarak ROS ile nitrik oksit arasındaki etkileşim sonucunda açığa çıkan nitrotirozın türevlerinin hem insan hem de hayvan kardiyomiyositlerinde apoptotik etkiye neden olduğu gösterilmiştir (Cai ve ark., 2005; Turko ve ark., 2003).

ROS'un Ca²⁺ homeostazisi ve miyokard kontraktılitesi üzerinde etkili olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. ROS varlığında SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase) proteininin 674. sistein rezidüsünde gerçekleşen irreversibl tiyol oksidasyonu SERCA aktivitesini bozarak sarkoplazmik retikulum Ca²⁺ geri alımını yavaşlatır (Adachi ve ark., 2004). Ying ve ark. SERCA⁶⁷⁴Sistein-Tiyol oksidasyonunun diyabetik hiperlipidemik aortada arttığını, hipergliseminin insülin ile kontrol altına alınmasının SERCA'da meydana gelen bu oksidasyonu önlediğini göstermişlerdir (Ying ve ark., 2008). Kuster ve ark. akut ROS maruziyetinin sarkoplazmik Ca²⁺ depolarını boşalttığını ve SERCA2a aktivitesini inhibe ettiğini bildirmişler, bu bozulmayı SERCA üzerinde gerçekleşen oksidatif tiyol modifikasyonlarına bağlamışlardır (Kuster ve ark., 2010). SERCA üzerinde bildirilen diğer bir oksidatif modifikasyon ise 294/295 rezidüsünde bulunan tirozinlerin

nitrasyonudur (Lancel ve ark., 2010). Çalışmalar AGEs'in PKC aktivitesini arttırarak Ca^{+2} metabolizmasında ve kardiyomiyosit kontraksiyonunda yer alan proteinlerin fosforilasyonuna neden olduğunu da göstermektedir (Braz ve ark., 2004; Coughlan ve ark., 2009).

Matrix metalloproteinazları (MMPs), hücre dışındaki matriks veya matriks dışı proteinleri yıkan çinko-bağımlı endopeptidazlardır. MMP aktivitesinin veya MMP/TIMP dengesinin kardiyak remodelling'de ve fibrotik süreçlerin gelişiminde önemli rolü olduğu bilinmektedir (Amalinei ve ark., 2007). Bazı çalışmalar özellikle MMP-2'nin sarkomerik troponin I proteini gibi spesifik intrasellüler hedeflerinin de olduğunu ortaya koymuştur (Wang ve ark., 2002). MMP-2'nin ekstrasellüler aralıkta proteolitik olarak aktive olabildiği gibi, nitrik oksit ile süperoksitin tepkimeye girmesi ile ortaya çıkan peroksinitrit ($ONOO^-$) radikali tarafından non-proteolitik olarak da aktive edilebileceği gösterilmiştir. (Viappiani ve ark., 2009). Taye ve ark. (2013), 8 haftalık tip I diyabet modelinde, diyabetik ratlara antioksidan etkinliği bilinen tempol maddesini uygulamışlar, sol ventrikül ROS düzeylerinde düşüş, MMP2 aktivitesinde artış, tip IV kollajen ve önemli bir profibrotik ajan olan TGF- β protein düzeylerinde azalma göstermişlerdir. Bu sonuçlar ROS'un MMP regülasyonunda önemli bir yere sahip olduğunu açıkça ortaya koymaktadır (Taye ve ark., 2013).

Han ve ark. (2009), STZ enjeksiyonu ile oluşturdukları 5 haftalık Tip I diyabetik farelerde kontraktıl parametrelerde bozulma ve VEGF proteinleri ile kapiller yoğunlukta azalma saptamışlardır. Ek olarak, diyabetik kalpte glutatyon disülfid (GSSG) düzeyinin yüksek olduğunu ve VEGF₁₆₄ protein miktarı ile GSSG miktarı arasında istatistiksel olarak önemli negatif bir korelasyon bulunduğunu saptamışlardır. Bu sonuçlar HIF-VEGF-anjiyogenez sinyal aksı ile oksidatif stres arasında bir ilişki olduğunu, diyabetin bu aksa etkisini oksidatif stres artışı üzerinden etkili olduğunu düşündürmektedir (Han ve ark., 2009).

Diyabetik kardiyomiyopatinin gelişiminin engellenmesine yönelik çalışmalarda ROS oluşumunu azaltan veya antioksidan savunma sistemlerini güçlendiren girişimler

önemli yer tutmaktadır (Sung ve ark., 2015). Düşük rakımlarda yaşayan sağlıklı bireylerin, yüksek irtifaya akut maruziyetlerinde serbest radikal oluşumunun artışına bağlı olarak oksidatif stres oluşumu gözlenmiştir (Bailey ve ark., 2009; Bailey ve ark., 2010). Yüksek irtifada mitokondriyal elektron transport zinciri (Chen ve ark., 2012), ksantin oksidaz, NADPH oksidaz ve nitrik oksit sentaz gibi çeşitli ROS kaynakları (Siques ve ark., 2014) aktive olmaktadır. Ek olarak enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistemlerde yüksek irtifaya maruziyet ile birlikte tükenme bildirilmiştir (Fan ve ark., 2013; Radak ve ark., 1994). Ancak aralıklı hipoksiye maruziyet, hipoksik önkoşullama ile kalpte kardiyoprotektif etkiye neden olmaktadır. Önkoşullama organizma için zararlı bir stimulusun, düşük dozda ve tekrarlı bir şekilde verilerek organizmanın savunma sistemleri için bir uyarı sinyali oluşturması ve organizmanın o stimulusa karşı toleransının geliştirilmesi esasına dayanır (Rybnikova ve Samoilov, 2015).

Literatürde hipoksik önkoşullamanın kardiyoprotektif etkileri ile ilgili çok sayıda yayın olmakla birlikte bu yayınlar genellikle HIF ve althedefleri üzerinden süreci açıklamaktadır. Hipoksik önkoşullamada kardiyoproteksiyon ile oksidatif stres arasındaki ilişkiye değinen az sayıda yayın bulunmaktadır. Herrera ve ark. (2015), Wistar tipi sıçanlara 32 gün boyunca, 96 saatlik hipobarik hipoksiyi ($\approx PO_2=90\text{mmHg}$), 96 saatlik normoksi periyodunun takip ettiği aralıklı hipoksi protokolünü uygulamışlardır. Deney protokollerini takiben sakrifiye edilen hayvanların kalpleri Langendorff düzeneğine asılmış ve 30 dakika iskemi/120 dakika reperfüzyona maruz bırakılmıştır. İskemi/reperfüzyon sonrasındaki toparlanma cevaplarının aralıklı hipoksi grubunda kontrol grubuna göre daha iyi olduğunu bildiren araştırmacılar, kalp dokusundaki nekrozun bir işareti olan LDH (laktat dehidrogenaz) seviyelerinin de aralıklı hipoksi grubunda kontrole göre azaldığını saptamışlardır. Bu kardiyoprotektif etkinin altında yatan nedeni anlamak adına HIF-1 α protein düzeyini saptayan araştırmacılar, HIF-1 α 'nın aralıklı hipoksi grubunda önemli artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Ek olarak oksidatif stres belirteçlerinden MDA'nın aralıklı hipoksi ile azalma gösterdiğini, nitrotirozinin ise değişmediğini vurgulayan araştırmacılar katalaz, SOD ve GSH gibi antioksidan enzimlerin seviyelerinde kontrole göre önemli artış göstermişlerdir (Herrera ve ark., 2015).

Antioksidan savunma kapasitesinde önemli bir değişiklik göstermemiş olmamız aralıklı hipoksinin bu etkiyi ağırlıklı olarak oksidan maddelerin oluşum hızını azaltarak yaptığını düşündürmektedir.

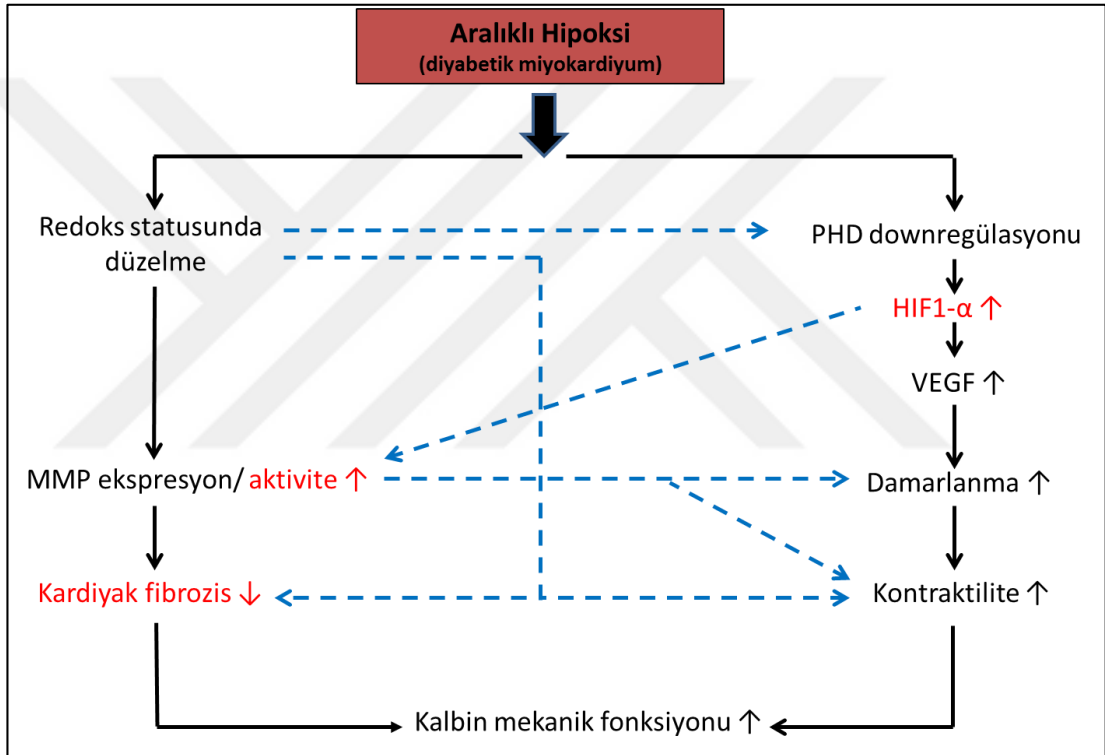
Fizyolojik konsantrasyonlarda reaktif oksijen türevleri hipoksiye (hem akut hem de aralıklı) karşı adaptif cevapların gelişiminde birer sinyal molekülü olarak rol alırken; belirli konsantrasyonların üzerinde ROS yapısal hücre hasarına, vasküler endotelyal disfonksiyona ve kardiyovasküler hastalıkların gelişimine neden olma potansiyeli de taşımaktadır (Knock ve Ward, 2011). Bu nedenle hipoksinin şiddeti, sıklığı ve süresi bir önkoşullama protokolünün başarısı açısından önemlidir. Tez çalışmamızda önkoşullama etkisini oluşturmak adına görece ılımlı bir aralıklı hipoksi protokolü tercih edilmiştir.

Oksidatif stresin MMP'ler aracılığıyla ve MMP'lerden bağımsız olarak fibrotik süreci hızlandığı, hücre içi kalsiyum parametrelerini etkileyerek kontraktiletiyi bozduğu, VEGF sinyalizasyonunu etkileyerek damarlanmayı bozduğu dikkate alındığında; tez çalışmamızda aralıklı hipoksi uygulamasının sağladığı redoks durumundaki düzelmenin ilgili yollar üzerinde olumlu yönde bir değişim yapmış olması beklenmelidir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER:

Tez çalışmamızdan elde edilen veriler ve literatür bilgisi ışığında;

1. Aralıklı hipoksi uygulamasının diyabetik kalpte mekanik fonksiyonda meydana gelen bozulma üzerinde önleyici bir etkiye sahip olduğu,
2. Bu etkinin kalpte HIF-VEGF-Damarlanma yolağı ve MMP- Kardiyak Remodelling sürecini regüle ederek gerçekleştiğı ileri sürülmektedir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Kronik aralıklı hipoksi uygulamasının diyabetik kalpte fonksiyon bozulmasını önleme mekanizmasında VEGF-damarlanma yolağı ve MMP'lerin rolü (kırmızı vurgular çalışmanın kısıtlarına işaret etmektedir).

5.1. Özgünlük

- 1) Çalışmamız diyabette aralıklı hipoksi uygulayan az sayıda çalışmadan birisi olup kullanılan moleküler yöntemler ve fonksiyonel ölçümler açısından özgünlük taşımaktadır.
- 2) Çalışmamızda aralıklı hipoksinin sol ventrikülde PHD ve MMP protein düzeylerine etkisini inceleyen ilk çalışmadır.
- 3) Çalışmamız Tip I diyabet modelinde PHD2 ve PHD3 düzeylerini inceleyen ilk çalışmadır.

5.2. Öneriler

- 1) Kalp HIF-1 α protein düzeyinin belirlenmesi çalışmanın yorum kabiliyetini arttıracaktır.
- 2) Kalpte MMP aktivitesi, kollajen içeriği ve TIMP düzeylerinin incelenmesi kardiyak remodelling'in daha ayrıntılı değerlendirilmesini sağlayacaktır.
- 3) Kimyasal hipoksi yapan ajanlar (CoCl₂ veya DMOG gibi) kullanılarak yapılacak yeni çalışmalar sistemik hipoksinin diffüz etkileri yerine HIF indüksiyonunun ortaya çıkaracağı etkileri izole olarak gözlemek adına faydalı olacaktır.
- 4) Takip eden çalışmalarda insülin düzeylerinin takip edilmesi ve/veya insülin tedavisi alan diyabetik grupların eklenmesi ile insülinin etkileri üzerine yorum yapmak mümkün hale gelecektir.
- 5) Takip eden çalışmalarda iskemi/reperfüzyon protokolünün eklenerek aralıklı hipoksinin toparlanma yanıtları üzerindeki etkisini görmek adına yararlı olacaktır.
- 6) Miyokardiyal enerji metabolizmasındaki değişimleri anlamak adına kardiyak GLUT1 ve GLUT4 protein düzeylerinin belirlenmesi varolan bilimsel probleme farklı bir açıdan yaklaşılma şansı verecektir.

ÖZET

Deneyisel Tip I Diyabette Aralıklı Hipoksinin Sol Ventrikül Fonksiyonları Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Diyabetlilerde sık görülen bir patoloji olan diyabetik kardiyomiyopati klinik olarak koroner arter hastalığı, hipertansiyon ve kapak hastalıklarından bağımsız olarak miyokardiyal yapı ve performansta meydana gelen bozulma olarak tanımlanmaktadır. STZ ile deneyisel olarak Tip I diyabet oluşturulan sıçanlarda, diyabet oluşumunu takiben 6. haftada diyabetik kardiyomiyopatinin tamamen geliştiği ortaya konmuştur.

Aralıklı hipoksinin olumlu etkilerini açığa çıkarmak için hipoksik önkoşullama yöntemi sıklıkla kullanılır. Hipoksik önkoşullama ılımlı şiddetteki hipoksinin aralıklı epizotlarla uygulanmasına dayanır; organizmanın oksijen yokluğunda kullandığı vasküler, metabolik ve nörolojik düzlemdeki kompleks savunma stratejilerini harekete geçirmeyi amaçlar. Hipoksinin bu etkilerini HIF molekülü üzerinden gösterdiği bilinmektedir. Tez çalışmamızda aralıklı hipoksi uygulaması ile HIF stabilizasyonunda artış sağlayarak diyabetik kardiyomiyopatiye karşı önleyici bir girişim yapılmaya çalışılmıştır.

Çalışmamızda 10 haftalık Wistar albino cinsi erkek sıçanlar dört gruba ayrılmıştır: 1) Kontrol (K), 2) Diyabet (DM), 3) Aralıklı Hipoksi (AH), 4) Diyabet+Aralıklı Hipoksi (DM+AH). Tip I diyabet oluşturmak için 11 haftalık hayvanlara tek doz (50 mg/kg) Streptozotosin (STZ) intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edilmiştir. Aralıklı hipoksi uygulanan hayvanlar, hipobarik hipoksik kamarada 42 gün boyunca, günde 6 saat, 3000 metreye denk, 69,3 kPa'lık (520 mmHg, $\approx 14\% O_2$) basınçta tutulmuşlardır.

Deney protokolünün sonunda Langendorff yöntemi ile kalp fonksiyonları ve inotropik rezerv ölçümleri yapılmış, Western Blot yöntemi ile VEGF, PHD2, PHD3, MMP-2 ve MMP-9 protein düzeyleri saptanmış, ayrıca immünohistokimya yöntemi ile sol ventrikül damarlanması ve serum ve kardiyak redoks statusu incelenmiştir.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, DM grubunda bozulan sol ventrikül fonksiyonunun DM+AH grubunda normal değerlere döndüğü, VEGF düzeyinin AH ve DM+AH gruplarında artış, PHD2 ve PHD3 düzeylerinin DM+AH grubunda düşüş gösterdiği, DM grubunda azalmış olan MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinin DM+AH grubunda kontrol düzeylerine döndüğü, sol ventrikül damarlanmasının DM+AH grubunda artış gösterdiğini, serum TAS ve TOS değerlerinde fark bulunmazken, miyokardiyal oksidatif stresin diyabette artış gösterdiği ve DM+AH grubunda normale döndüğü saptanmıştır.

Tez çalışmamızdan elde edilen verilerin literatür bilgisi ışığında tartışılmasıyla aralıklı hipoksi uygulamasının; VEGF-damarlanma yolağını indükleyerek ve kalbin redoks statusunu düzelterek MMP düzeylerini ve kardiyak remodelling sürecini regüle ederek tip I diyabet modelinde kardiyomiyopati gelişimine karşı koruyucu etki gösterebileceği ve diyabetik kalbin mekanik fonksiyonunda gösterilen düzelmenin bu koruyucu etki ile ilişkili olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Anjiyogenez, Aralıklı Hipoksi, Diyabetik Kardiyomiyopati, MMP, PHD, Redoks Statusu, VEGF.

SUMMARY

Investigation of the effects of Intermittent Hypoxia on Left Ventricle Functions in Experimental Type I Diabetes

Diabetic cardiomyopathy is a common pathology which is seen in diabetic patients. It is described as myocardial structural and functional abnormality where there is no coroner artery disease, hypertension or valve diseases. Diabetic cardiomyopathy develops completely 6 weeks after injection, in STZ-induced Type I diabetic rats.

Hypoxic preconditioning method is widely used to disclose the beneficial effects of intermittent hypoxia. Hypoxic preconditioning, is repetitive application of moderate hypoxic sessions. It evokes vascular, metabolic and neurologic defense strategies which are used by organism in oxygen deprivation. Hypoxia manifests its effects via HIF molecule. In our study, we tried to increase HIF stabilization to prevent diabetic cardiomyopathy.

Wistar albino rats were randomly divided in four groups: 1) Control (K), 2) Diabetes (DM), 3) Intermittent Hypoxia (AH), 4) Diabetes + Intermittent Hypoxia (DM+AH). Single dose (50 mg/kg) STZ injected (i.p) to 11-week old animals to establish Type I diabetes model. Intermittent hypoxia group were put into hypobaric hypoxic chamber which simulates 3000 meter altitude (520 mmHg, $\approx 14\% \text{ O}_2$), 6 hours/day for 42 days.

After experimental procedures we measured cardiac functions and inotropic reserve with Langendorff's method; VEGF, PHD2, PHD3, MMP-2 and MMP-9 protein levels were determined with Western Blot method; left ventricle capillarization were measured with immunohistochemistry method and we also examined redox status both in serum and myocardium.

According to statistical analysis, deteriorated left ventricle function in DM group, was restored in DM+AH group; VEGF levels were elevated in AH and DM+AH groups; PHD2 and PHD3 levels were declined in DM+AH group; declined MMP-2 and MMP-9 levels in diabetic rats were restored in DM+AH group; left ventricular capillarity was increased in DM+AH group; serum TAS and TOS levels were similar in all groups but myocardial oxidative stress was elevated in DM group, this elevation was restored in DM+AH group.

According to current data and literature, we can tell that intermittent hypoxia induces VEGF-angiogenesis pathway; restores cardiac redox status and regulates cardiac remodelling by increasing MMP levels. If we consider all those mechanisms we can tell intermittent hypoxia is cardioprotective and functional recovery that we observed in DM+AH group may be related with those molecular pathways.

Key Words: Angiogenesis, Diabetic Cardiomyopathy, Intermittent Hypoxia, MMP, PHD, Redox Status, VEGF

KAYNAKLAR

ABACI A, OGUZHAN A, KAHRAMAN S, ERYOL NK, UNAL S, ARINC H, ERGIN A (1999). Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation*, **99**: 2239–2242.

ABDEL AZIZ MT, EL-ASMAR MF, HAIDARA M, ATTA HM, ROSHDY NK, RASHED LA, SABRY D, YOUSSEF MA, ABDEL AZIZ AT, MOUSTAFA M (2008). Effect of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells On Cardiovascular Complications in Diabetic Rats. *Med Sci Monit*, **14(11)**: 249-255.

ABE T, OHGA Y, TABAYASHI N, KOBAYASHI S, SAKATA S, MISAWA H, TSUJI T, KOHZUKI H, SUGA H, TANIGUCHI S, TAKAKI M (2002). Left ventricular diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus model rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **282**: 138-148.

ACAR E, URAL D, BILDIRICI U, SAHİN T, YILMAZ I (2011). Diabetic cardiomyopathy. *Anadolu Kardiyol Derg*, **11(8)**: 732-737.

ADACHI T, WEISBROD RM, PIMENTEL DR, YING J, SHAROV VS, SCHONEICH C (2004). S-glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med*, **10(11)**: 1200–1207.

AMĂLINEI C, CĂRUNTU ID, BĂLAN RA (2007). Biology of metalloproteinases. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, **48(4)**: 323–334.

ANEJA A, TANG WHW, BANSAIL S, GARCIA MJ, FARKOUH ME (2008). Diabetic Cardiomyopathy: Insights into Pathogenesis Diagnostic Challenges and Therapeutic Options. *The American Journal of Medicine*, **121**: 748-757.

ARGIROVA MD, ORTWERTH BJ (2003). Activation of protein-bound copper ions during early glycation: study on two proteins. *Arch Biochem Biophys*, **420**: 176-184.

ASRIH M, STEFFENS S (2013). Emerging role of epigenetics and miRNA in diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Pathology*, **22**: 117–125.

ASTORRI E, FIORINA P, CONTINI GA, ALBERTINI D, MAGNATI G, ASTORRI A, LANFREDINI M (1997). Isolated and preclinical impairment of left ventricular filling in insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetic patients. *Clin Cardiol*, **20**: 536-540.

BAIBAS N, TRICHOPOULOU A, VORIDIS E, TRICHOPOULOS D (2005). Residence in mountainous compared with lowland areas in relation to total and coronary mortality. A study in rural Greece. *J Epidemiol Community Health*, **59**: 274-278.

BAILEY DM, DAVIES B, BAKER J (2000). Training in hypoxia: modulation of metabolic and cardiovascular risk factors in men. *Med Sci Sports Exerc*, **32(6)**: 1058–1066.

BAILEY DM, EVANS KA, JAMES PE, MCENENY J, YOUNG IS, FALL L, GUTOWSKI M, KEWLEY E, MCCORD JM, MØLLER K (2009). Altered free radical metabolism in acute mountain sickness: Implications for dynamic cerebral autoregulation and blood-brain barrier function. *J Physiol*, **587**: 73–85.

BAILEY DM, DEHNERT C, LUKS AM, MENOLD E, CASTELL C, SCHENDLER G, FAORO V, GUTOWSKI M, EVANS KA, TAUDORF S (2010). High-altitude pulmonary hypertension is associated with a free radical-mediated reduction in pulmonary nitric oxide bioavailability. *J Physiol*, **588**: 4837–4847.

BANERJEE SS, THIRUNAVUKKARASU M, RISHI MT, SANCHEZ JA, MAULIK N, MAULIK G (2012). HIF–prolyl hydroxylases and cardiovascular diseases. *Toxicology Mechanisms and Methods*, **22**(5): 347–358.

BAO W, QIN P, NEEDLE S, ERICKSON-MILLER CL, DUFFY KJ, ARIAZI JL, ZHAO S, OLZINSKI AR, BEHM DJ, PIPES GC, JUCKER BM, HU E, LEPORE JJ, WILLETTE RN. (2010). Chronic inhibition of hypoxia-inducible factor (hif) prolyl 4-hydroxylase improves ventricular performance, remodeling and vascularity following myocardial infarction in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol*, **56**(2): 147–155.

BARDOS JI, ASHCROFT M (2005). Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim Biophys Acta*, **1755**: 107–120.

BELAIDI E, BEGUIN PC, LEVY P, RIBUOT C, GODIN-RIBUOT D (2008). Prevention of HIF-1 activation and iNOS gene targeting by low-dose cadmium results in loss of myocardial hypoxic preconditioning in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **294**(2): 901–908.

BENITA Y, KIKUCHI H, SMITH AD, ZHANG MQ, CHUNG DC, XAVIER RJ (2009) . An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res*, **37**: 4587–4602.

BENTO CF, PEREIRA P (2011). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 and the loss of the cellular response to hypoxia in diabetes. *Diabetologia*, **54**: 1946–1956.

BERG TJ, SNORGAARD O, FABER J, TORJESEN PA, HILDEBRANDT P, MEHLSSEN J, HANSEN KF (1999). Serum levels of advanced glycation end products are associated with left ventricular diastolic function in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, **22**(7): 1186–1190.

BERRA E, ROUX D, RICHARD DE, POUYSSÉGUR J (2001). Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) escapes O₂-driven proteasomal degradation irrespective of its subcellular localization: nucleus or cytoplasm. *EMBO Rep*, **2**: 615–620.

BERRA E, BENIZRI E, GINOUVÈS A, VOLMAT V, ROUX D, POUYSSÉGUR J (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J*, **22**: 4082–4090.

BERRA E, GINOUVÈS A, POUYSSÉGUR J (2006). The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep*, **7**: 41–45.

BERS DM (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, **415**: 198–205.

BERTRAND L, HORMAN S, BEAULOYE C, VANOVERSCHDELDE JL (2008). Insulin signaling in the heart. *Cardiovasc Res*, **79**: 238–248.

BIROT OJG, PEINNEQUIN A, SIMLER N, CUYCK-GANDRE HV, HAMEL R, BIGARD XA (2004). Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Heart of Rats Exposed to Hypobaric

Hypoxia: Differential Response Between mRNA and Protein. *Journal Of Cellular Physiology*, **200**: 107–115.

BOLLANO E, OMEROVIC E, SVENSSON H, WAAGSTEIN H, FU M (2007). Cardiac remodeling rather than disturbed myocardial energy metabolism is associated with cardiac dysfunction in diabetic rats. *International Journal of Cardiology*, **114**: 195 – 201.

BORDUN KAM, JASSAL DS, DHALLA NS (2014). Metabolic Alterations in Diabetic Cardiomyopathy. B. Turan and NS Dhall (eds.) *Diabetic Cardiomyopathy: Biochemical and Molecular Mechanisms.*, New York: Springer Science+Business Media.

BOUDINA S, ABEL ED (2006). Mitochondrial uncoupling: a key contributor to reduced cardiac efficiency in diabetes. *Physiology*, **21**: 250-258.

BOUDINA S, ABEL ED (2010). Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorder*, **11(1)**: 31–39.

BRAUNHUT SJ, MOSES MA (1994). Retinoids modulate endothelial cell production of matrix-degrading proteases and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP). *J Biol Chem*, **269**: 13472-13479.

BRAZ JC, GREGORY K, PATHAK A (2004). PKC- α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nature Medicine*, **10(3)**: 248–254.

BROWNLEE M (1995). Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med*, **46**: 223–234.

BROWNLEE M (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, **54(6)**: 1615–1625.

BRUMMER O, BÖHMER G, HOLLWITZ B, FLEMMING P, PETRY KU, KÜHNLE H (2002). MMP-1 and MMP-2 in the cervix uteri in different steps of malignant transformation - an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol*, **84(2)**: 222–227

BUIJS J, MIKLOS Z, RIELA NAW, PRESTIAB CM, SZENCZIB O, TOTTH A, VUSSED GJV, SZABO C, LIGETI L, IVANIC T (2005). β -Adrenergic activation reveals impaired cardiac calcium handling at early stage of diabetes. *Life Sciences*, **76**: 1083–1098.

BURTSCHER M (2014). Effects of Living at Higher Altitudes on Mortality: A Narrative Review. *Aging and Disease*, **5(4)**: 274-280.

CABALLERO AE, ARORA S, SAOUAF R, LIM SC, SMAKOWSKI P, PARK JY, KING GL, LOGERFO FW, HORTON ES, VEVES A (1999). Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes*, **48**: 1856–1862.

CAI L, WANG J, LI Y (2005). Inhibition of superoxide generation and associated nitrosative damage is involved in metallothionein prevention of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*, **54**: 1829-1837.

CAI Z, MANALO DJ, WEI G, RODRIGUEZ ER, FOX-TALBOT K, LU H, ZWEIER JL, SEMENZA GL (2003). Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia–reperfusion injury. *Circulation*, **108**: 79–85.

CAI Z, ZHONG H, BOSCH-MARCE M, FOX-TALBOT K, WANG L, WEI C, TRUSH MA, SEMENZA GL (2008). Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha. *Cardiovasc Res*, **77(3)**: 463–470.

CAO J, VECOLI C, NEGLIA D, TAVAZZI B, LAZZARINO G, NOVELLI M, MASIELLO P, WANG Y, PURI N, PAOLOCCI N, L'ABBATE A, ABRAHAM NG (2012). Cobalt-Protoporphyrin Improves Heart Function by Blunting Oxidative Stress and Restoring NO Synthase Equilibrium in an Animal Model of Experimental Diabetes. *Front Physiol*, **3**: 1-9.

CARMELIET P (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, **6(4)**: 389–395, 2000.

CARROL R, CARLEY AN, DYCK JR SEVERSON DL (2005). Metabolic effects of insulin on cardiomyocytes from control and diabetic db/db mouse hearts. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **288**: 900-906.

CATRINA SB (2014). Impaired hypoxia-inducible factor (HIF) regulation by hyperglycemia. *J Mol Med*, **92**: 1025–1034.

CAWSTON T (1998). Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases. *Molecular Medicine Today*, **3**: 130-137.

CERIELLO A (2005). Acute hyperglycaemia: a “new” risk factor during myocardial infarction. *European Heart Journal*, **26(4)**: 328–331.

CHATZIGEORGIOU A, HALAPAS A, KALAFATAKIS K, KAMPER E (2009) The Use of Animal Models in the Study of Diabetes Mellitus. *In Vivo*, **23**: 245-258.

CHEN J, GAO Y, LIAO W, HUANG J, GAO W (2012). Hypoxia affects mitochondrial protein expression in rat skeletal muscle. *OMICS*, **16**: 98–104.

CHEN X, ZHAO T, HUANG X, WU L, WU K, FAN M, ZHU L (2016). Intermittant Hypoxia Maintains Glycemia in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Cell Stress and Chaperones*, **21**: 515–522.

CHI JT, WANG Z, NUYTEN D, RODRIGUEZ EH, SCHANER ME, SALIM A, WANG Y, KRISTENSEN GB, HELAND A, BØRRESEN-DALE AL, GIACCIA A, LONGAKER MT, HASTIE T, YANG GP, VAN DE VIJVER MJ, BROWN PO (2006). Gene expression programs in response to hypoxia: Cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Med*, **3**: 395–409.

CHIU J, FARHANGKHOEE H, XU BY, CHEN S, GEORGE B, CHAKRABARTI S (2008). PARP mediates structural alterations in diabetic cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **45(3)**: 385–393.

CHOU E, SUZUMA I, WAY KJ, OPLAND D, CLERMONT AC, NARUSE K, SUZUMA K, BOWLING NL, VLAHOS CJ, AIELLO LP, KING GL (2010). Decreased Cardiac Expression of

Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in Insulin-Resistant and Diabetic States. *Circulation*, **105**: 373-379.

COCKMAN ME, MASSON N, MOLE DR, JAAKKOLA P, CHANG GW, CLIFFORD SC, MAHER ER, PUGH CW, RATCLIFFE PJ, MAXWELL PH (2000). Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem*, **275**: 25733–25741.

COUGHLAN MT, THORBURN DR, PENFOLD SA (2009). Rage induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology*, **20**(4): 742–752.

CREAGER MA, LUSCHER TF (2003). Diabetes and vascular disease pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation*, **108**: 1527-1532.

CURRY TE, OSTEEN KG (2003). The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev*, **24**(4): 428–465.

DAS AK, DAS JP, CHANDRASEKAR S (1987). Specific heart muscle disease in diabetes mellitusda functional structural correlation. *Int J Cardiol*, **17**: 299-302.

DEL PESO L, CASTELLANOS MC, TEMES E, MARTIN-PUIG S, CUEVAS Y, OLMOS G, LANDAZURI MO (2003). The von Hippel Lindau/hypoxia inducible factor (HIF) pathway regulates the transcription of the HIF-proline hydroxylase genes in response to low oxygen. *J Biol Chem*, **278**: 48690–48695.

DEVEREUX RB, ROMAN MJ, PARANICAS M, O'GRADY MJ, LEE ET, WELTY TK, FABSITZ RR, ROBBINS D, RHOADES ER, HOWARD BV (2000). Impact of diabetes on cardiac structure and function: the Strong Heart Study. *Circulation*, **101**: 2271-2276.

DING HL, ZHU HF, DONG JW, ZHU WZ, YANG WW, YANG HT, ZHOU ZN (2005). Inducible nitric oxide synthase contributes to intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury. *Acta Pharmacologica Sinica*, **26**(3): 315-322.

DIRKX E, SCHWENK RW, GLATZ JF, LUIKEN JJ, VAN EYS GJ (2011). High fat diet induced diabetic cardiomyopathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **85**: 219-225.

DONG JW, ZHU HF, DING HL, MA TM, ZHOU ZN (2003). Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression. *Cell Research*, **13**(5): 385-391.

DU X, MATSUMURA T, EDELSTEIN D, ROSSETTI L, ZSENGELLÉR Z, SZABO C, BROWNLEE M (2003). Inhibition of GADPH activity by poly (ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest*, **112**: 1049-1057.

EATON JW, QIAN M (2002). Interactions of copper with glycated proteins: possible involment in the etiology of diabetic neuropathy. *Mol Cell Biochem*, **234-235**(1-2):135-142.

ECKLE T, KOHLER D, LEHMANN R, ELKASMI K, ELTZSCHIG HK (2008). Hypoxia-induciblefactor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning. *Circulation*, **118**: 166–175.

EPSTEIN AC, GLEADLE JM, MCNEILL LA, HEWITSON KS, O'ROURKE J, MOLE DR, MUKHERJI M, METZEN E, WILSON MI, DHANDA A, TIAN YM, MASSON N, HAMILTON DL, JAAKKOLA P, BARSTEAD R, HODGKIN J, MAXWELL PH, PUGH CW, SCHOFIELD CJ, RATCLIFFE PJ (2001). C. Elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, **107**: 43–54.

ESPER RJ, VILARINO JO, MACHADO RA, PARANGO A (2008). Endothelial dysfunction in normal and abnormal glucose metabolism. *Adv Cardiol*, **45**: 17-43.

FAEH D, GUTZWILLER F, BOPP M (2009). Lower mortality from coronary heart disease and stroke at higher altitudes in Switzerland. *Circulation*, **120**: 495-501.

FAN PC, MA HP, JING LL, LI L, JIA ZP (2013). The antioxidative effect of a novel free radical scavenger 4'-hydroxyl-2-substituted phenylnitronyl nitroxide in acute high-altitude hypoxia mice. *Biol Pharm Bull*, **36**: 917–924.

FARAMOUSHI M, SASAN RA, SARRAF VS, KARIMI P (2016). Cardiac fibrosis and down regulation of GLUT4 in experimental diabetic cardiomyopathy are ameliorated by chronic exposures to intermittent altitude. *J Cardiovasc Thorac Res*, **8(1)**: 26-33.

FERRARA N (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, **18**: 4–25.

FERRARA N, GERBER HP, LECOUTER J (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, **9(6)**: 669-676.

FINCK BN, LEHMAN JJ, LEONE TC (2002). The cardiac phenotype induced by PPAR α overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest*, **109**: 121-130.

FILIPPO CD, CUZZOCREA S, ROSSI F, MARFELLA R, D'AMICO M (2006). Oxidative stress as the leading cause of acutemyocardial infarction in diabetics. *Cardiovascular Drug Reviews*, **24(2)**: 77–87.

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

FIORDALISO F, CUCCOVILLO I, BIANCHI R, BAI A, DONI M, SALIO M, DE ANGELIS N, GHEZZI P, LATINI R, MASSON S (2006). Cardiovascular oxidative stress is reduced by an ACE inhibitor in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Life Sci*, **79**: 121-129.

FORSYTHE JA, JIANG BH, IYER NV, AGANI F, LEUNG SW, KOOS RD, SEMENZA GL (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia inducible factor 1. *Molecular and Cellular Biology*, **16(9)**: 4604–4613.

FOY JM, LUCAS PD (1978). Comparison between spontaneously beating atria from control and streptozocin-diabetic rats. *J Pharm Pharmacol*, **30(9)**: 558-562.

FULCO CS, ROCK PB, CYMERMAN A (2000). Improving athletic performance: is altitude residence or altitude training helpful? *Aviat Space Environ Med* **71**: 162–171.

GAMBOA JL, GARCIA-CAZARIN ML, ANDRADE FH (2011). Chronic hypoxia increases insulin-stimulated glucose uptake in mouse soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **300**: 85–91.

GAO WD, LIU Y, MARBAN E (1996). Selective effects of oxygen free radicals on excitation-contraction coupling in ventricular muscle. Implications for the mechanism of stunned myocardium. *Circulation*, **42**: 2597-2604.

GERALDES P, KING GL (2010). Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res*, **106**: 1319-1331.

GERBER HP, CONDORELLI F, PARK J, FERRARA N (1997). Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is upregulated by hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*, **272(38)**: 23659–23667.

GESS B, SCHRICKER K, PFEIFER M, KURTZ A (1997). Acute hypoxia upregulates NOS gene expression in rats. *Am J Physiol*, **273(2)**: 905–910.

GIACCO F, BROWNLEE M (2010). Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circ Res*, **107**: 1058-1070.

GOLDIN A, BECKMAN JA, SCHMIDT AM, CREAGER MA (2006). Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*, **114(6)**: 597–605.

GREIJER AE, VAN DER GROEP P, KEMMING D (2005). Up-regulation of gene expression by hypoxia is mediated predominantly by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). *J Pathol*, **206(3)**: 291-304.

GROSS J, LAPIERE CM (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, **48**: 1014–1022.

HA T, KOTSANAS G, WENDT I (1999). Intracellular Ca²⁺ and adrenergic responsiveness of cardiac myocytes in streptozotocin-induced diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **26(4)**: 347-353

HAFFNER SM, LEHTO S, RÖNNEMAA T, PYÖRALA K, LAAKSO M (1998). Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*, **339**: 229-234.

HALSE R, PEARSON SL, MCCORMACK JG, YEAMAN SJ, TAYLOR R (2001). Effects of tumor necrosis factor-alpha on insulin action in cultured human muscle cells. *Diabetes*, **50**: 1102-1109.

HAN B, BALIGA R, HUANG H, GIANNONE PJ, BAUER JA (2009) Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and redox imbalance in murine diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **297**: 829–835.

HASHIZUME K (2007). Analysis of utero-placental-specific molecules and their functions during implantation and placentation in the bovine. *J Reprod Dev*, **53(1)**: 1–11.

HAUSENLOY DJ, YELLON DM (2010). The second window of preconditioning (SWOP) where are we now? *Cardiovasc Drugs Ther*, **24**: 235–254.

HAYAT SA, PATEL B, KHATTAR RS, MALIK RA (2004). Diabetic cardiomyopathy: mechanisms diagnosis and treatment. *Clinical Science*, **107**: 539-557.

HEATHER LC, CLARKE K (2011). Metabolism, hypoxia and the diabetic heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **50**: 598-605.

HERRERA EA, FARIAS JG, GONZÁLEZ-CANDIA A, SHORT SE, CARRASCO-POZO C, CASTILLO RL (2015). Ω 3 Supplementation and Intermittent Hypobaric Hypoxia Induce Cardioprotection Enhancing Antioxidant Mechanisms in Adult Rats. *Mar Drugs*, **13**: 838-860.

HERRERO P, PETERSON LR, MCGILL JB, MATTHEW S, LESNIAK D, DENCE C, GROPLER RJ (2006). Increased myocardial fatty acid metabolism in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*, **47**: 598-604.

HIROTA K, SEMENZA GL (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol*, **59**: 15-26.

HOFFMAN EC, REYES H, CHU FF, SANDER F, CONLEY LH, BROOKS BA, HANKINSON O (1991). Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science*, **252**: 954-958.

HOIT BD, CASTRO C, BULTRON G, KNIGHT S, MATLIB MA (1999). Noninvasive evaluation of cardiac dysfunction by echocardiography in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Card Fail*, **5**: 324-333.

HOLSCHER M, SILTER M, KRULL S, VONAHLEN M, HESSE A, SCHWARTZ P, WIELOCKX B, BREIER G, KATSCHINSKI DM, ZIESENIS A (2011). Cardiomyocyte-specific prolyl-4 hydroxylase domain 2 knock out protects from acute myocardial ischemic injury. *J Biol Chem*, **286**: 11185-11194.

HONG SS, LEE H, KIM KW (2004). HIF-1 α : A Valid Therapeutic Target for Tumor Therapy. *Cancer Research and Treatment*, **36(6)**: 343-353.

HOPPS E, CAIMI G (2015). Matrix metalloproteases as a pharmacological target in cardiovascular diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, **19**: 2583-2589.

HUA Y, NAIR S (2015). Proteases in cardiometabolic diseases: Pathophysiology, molecular mechanisms and clinical applications. *Biochim Biophys Acta*, **1852(2)**: 195-208.

HUANG J, ZHAO Q, MOONEY SM, LEE FS (2002). Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1 α for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem*, **277**: 39792-39800.

HUANG T, HUANG W, ZHANG Z, YU L, XIE C, ZHU D, PENG Z, CHEN J (2014). Hypoxia-inducible factor-1 alpha upregulation in microglia following hypoxia protects against ischemia-induced cerebral infarction. *Neuroreport*, **25(14)**: 1122-1128.

HYVARINEN J, HASSINEN IE, SORMUNEN R, MAKI JM, KIVIRIKKO KI, KOIVUNEN P, MYLLYHARJU J (2010). Hearts of hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase-2 hypomorphic mice show protection against acute ischemia-reperfusion injury. *J Biol Chem*, **285**: 13646-13657.

IDF (International Diabetes Federation) (2015), International Diabetes Atlas. ISBN: 978-2-930229-81-2.

II M, YAMAMOTO H, ADACHI Y, MARUYAMA Y, SHINOMURA Y (2006). Role of MMP-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med*, **231**(1): 20–27.

IQBAL T, WELSBY PJ, HOWARTH FC, BİDASEE K, ADEGHATE E, SINGH J (2014). Effects of diabetes-induced hyperglycemia in the heart: biochemical and structural alterations. B. Turan and NS Dhalla (eds.) *Diabetic Cardiomyopathy: Biochemical and Molecular Mechanisms.*, New York: Springer Science+Business Media.

ITOH T, TANIOKA M, YOSHIDA H, YOSHIOKA T, NISHIMOTO H, ITOHARA S (1998). Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res*, **58**: 1048–1051.

IVAN M, KONDO K, YANG H, KIM W, VALIANDO J, OHH M, SALIC A, ASARA JM, LANE WS, KAEHLIN WG JR (2001) . HIF alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, **292**: 464–468.

JAAKKOLA P, MOLE DR, TIAN YM, WILSON MI, GIELBERT J, GASKELL SJ, VON KRIEGSHEIM A, HEBESTREIT HF, MUKHERJI M, SCHOFIELD CJ, MAXWELL PH, PUGH CW, RATCLIFFE PJ (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, **292**: 468–472.

JAOUDE J, KOH Y (2016). Matrix metalloproteinases in exercise and obesity. *Vascular Health and Risk Management*, **12**: 287–295

JEONG JW, BAE MK, AHN MY, KIM SH, SOHN TK, BAE MH, YOO MA, SONG EJ, LEE KJ, KIM KW (2002). Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, **111**: 709–720.

JESMIN S, ZAEDI S, SHIMOJO N, IEMITSU M, MASUZAWA K, YAMAGUCHI N, MOWA CN, MAEDA S, HATTORI Y, MIYAUCHI T (2007). Endothelin antagonism normalizes VEGF signaling and cardiac function in STZ-induced diabetic rat hearts. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **292**: 1030–1040.

JIANG BH, SEMENZA GL, BAUER C, MARTI HH (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol*, **271**: 1172–1180.

JOFFE II, TRAVERS KE, PERREAULT-MICALE CL, HAMPTON T (1999). Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced, non–insulin-dependent diabetic rat. *J Am Coll Cardio*, **34**: 2111–2119.

JOHN A, TUSZYNSKI G (2001). The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res*, **7**(1): 14–23.

JOYEUX M, FAURE P, GODIN-RIBUOT D, HALIMI S, PATEL A, YELLONC DM, DEMENGEA P, RIBUOTA C (1999). Heat stress fails to protect myocardium of streptozotocin-induced diabetic rats against infarction. *Cardiovascular Research*, **43**: 939–946.

KAMPER M, TSIMPOUKIDI O, CHATZIGEORGIOU A, LYMBERI M, KAMPER EF (2010). The antioxidant effect of angiotensin II receptor blocker, losartan, in streptozotocin-induced diabetic rats. *Translational Research*, **156(1)**: 26-35.

KANNEL WB, HJORTLAND M, CASTELLI WP (1974). Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol*, **34**: 29-34.

KATSCHINSKI DM (2009). *In vivo* functions of the prolyl-4-hydroxylase domain oxygen sensors: direct route to the treatment of anaemia and the protection of ischaemic tissues. *Acta Physiol*, **195**: 407–414.

KERKELA R, KARSIKAS S, SZABO Z, SERPI R, MAGGA J, GAO E, ALITALO K, ANISIMOV A, SORMUNEN R, PIETILÄ I, VAINIO L, KOCH WJ, KIVIRIKKO KI, MYLLYHARJU J, KOIVUNEN P (2013). Activation of hypoxia response in endothelial cells contributes to ischemic cardioprotection. *Mol Cell Biol*, **33**: 3321–3329.

KHARBANDA RK, MORTENSEN UM, WHITE PA, KRISTIANSEN SB, SCHMIDT MR, HOSCHTITZKY JA, VOGEL M, SORENSEN K, REDINGTON AN, MACALLISTER R (2002). Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation*, **106**: 2881–2883.

KHATTER JC, SADRI P, ZHANG M, HOESCHEN RJ (1996). Myocardial angiotensin II (Ang II) receptors in diabetic rats. *Ann N York Acad Sci*, **793**: 466-472.

KIDO M, DU L, SULLIVAN CC, LI X, DEUTSCH R, JAMIESON SW, THISTLETHWAITE PA (2005). Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha Reduces Infarction and Attenuates Progression of Cardiac Dysfunction After Myocardial Infarction in the Mouse. *JACC*, **46(11)**: 2116–2124.

KNOCK GA, WARD JP (2011). Redox regulation of protein kinases as a modulator of vascular function. *Antioxid Redox Signal*, **15**: 1531–1547.

KROCK BL, SKULI N, SIMON MC (2011). Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes and Cancer*, **2(12)**: 1117–1133.

KUSTER GM, LANCEL S, ZHANG J, COMMUNAL C, TRUCILLO MP, LIM CC (2010). Redox-mediated reciprocal regulation of SERCA and Na⁺-Ca²⁺ exchanger contributes to sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med*, **48(9)**: 1182–1187.

KUZUYA M, SATAKE S, AI S, ASAI T, KANDA S, RAMOS MA, MIURA H, UEDA M, IGUCHI A (1998). Inhibition of angiogenesis on glycosylated collagen lattices. *Diabetologia*, **41**: 491–499.

KUZUYA T, HOSHIDA S, YAMASHITA N, FUJI H, OE H, HORI M, KAMADA T, TADA M (1993). Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res*, **72**: 1293–1299.

LAMBERT P, BINGLEY PJ (2002). What is Type 1 Diabetes? *Medicine*, **30**: 1–5.

LAHAYE SLD, DELAMARCHE AG, MALARDÉ L, VINCENT S, ZGUIRA MS, MOREL SL, DELAMARCHE P, ZOUHAL H, CARRÉ F, BEKONO FR (2010). Intense exercise training induces adaptation in expression and responsiveness of cardiac β -adrenoceptors in diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology*, **9**: 72-81.

LANCEL S, QIN F, LENNON SL, ZHANG J, TONG X, MAZZINI MJ (2010). Oxidative posttranslational modifications mediate decreased SERCA activity and myocyte dysfunction in α q-overexpressing mice. *Circ Res*, **107**(2): 228–232.

LANDO D, PEET DJ, GORMAN JJ, WHELAN DA, WHITELAW ML, BRUICK RK (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev*, **16**: 1466–1471.

LAVIE L (2003). Obstructive sleep apnoea syndrome – an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev*, **7**(1):35–51.

LAVIE L, LAVIE P (2006). Ischemic preconditioning as a possible explanation for the age decline relative mortality in sleep apnea. *Med Hypotheses*, **66**(6):1069–1073.

LEI L, MASON S, LIU D, HUANG Y, MARKS C, HICKEY R, JOVIN IS, PYPAERT M, JOHNSON RS, GIORDANO FJ (2008). Hypoxia-inducible factor-dependent degeneration, failure, and malignant transformation of the heart in the absence of the von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell Biol*, **28**: 3790–3803.

LI Q, SUN S, WANG Y, TIAN Y, LIU M (2007). The roles of MMP2/TIMP-2 in extracellular matrix remodelling in the hearts of STZ-induced diabetic rats. *Acta Cardiol*, **62**(5): 485–491.

LI SY, YANG X, CEYLAN-ISIK AF, DU M, SREEJAYAN N, REN J (2006). Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. *Diabetologia*, **49**: 1434–1446.

LIGETI L, SZENCZI O, PRESTIA CM, SZABO C, HORVATH K, MARCSEK ZL, STIPHOUT RV, RIEL NV, BUIJS JD, VUSSE GR, IVANICS T (2006). Altered Calcium Handling Is An Early Sign Of Streptozotocin-Induced Diabetic Cardiomyopathy. *International Journal Of Molecular Medicine*, **17**: 1035–1043.

LINTHOUT SV, SEELAND U, RIAD A, ECKHARDT O, HOHL M, DHAYAT N, RICHTER U, FISCHER JW, BÖHM M, PAUSCHINGER M, SCHULTHEISS HP, TSCHÖPE C (2008). Reduced MMP-2 activity contributes to cardiac fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*, **103**: 319–327.

LIU X, SUZUKI H, SETHI R, TAPPIN RS, TAKEDA N, DHALLA NS (2006). Blockade of the renin- angiotensin system attenuates sarcolemma and sarcoplasmic reticulum remodelling in chronic diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, **1084**: 141–154.

LIU Y, COX SR, MORITA T, KOUREMBANAS S (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells: Identification of a 5' enhancer. *Circulation Research*, **77**(3): 638–643.

LOPASCHUK GD (2002). Metabolic abnormalities in the diabetic heart. *Heart Fail Rev*, **7**: 149–159.

LORENZO O, RAMIREZ E, PICATOSTE B, EGIDO J, TUÑÓN J (2013). Alteration of Energy Substrates and ROS Production in Diabetic Cardiomyopathy. *Mediators of Inflammation*, **2013**: 1–11.

LU J, YAO Y, DAI Q, MA G, ZHANG S, CAO L, REN L, LIU N (2012). Erythropoietin Attenuates Cardiac Dysfunction by Increasing Myocardial Angiogenesis and Inhibiting Interstitial Fibrosis in Diabetic Rats. *Cardiovascular Diabetology*, **11**: 105-116.

LUO Y, HE DL, NING L, SHEN SL, LI L, LI X, ZHAU HE AND CHUNG LW (2006). Over-expression of hypoxia-inducible factor-1 α increases the invasive potency of LNCaP cells in vitro. *BJU Int*, **98**: 1315-1319.

MA G, AL-SHABRAWAY M, JOHNSON JA, DATAR R, TAWFIK HE, GUO D, CALDWELL RB, CALDWELL RW (2006). Protection against myocardial ischemia/reperfusion injury by short-term diabetes: enhancement of VEGF formation, capillary density, and activation of cell survival signaling. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **373**: 415–427.

MAALOUF RM, EID AA, GORIN YC (2012). Nox4-derived reactive oxygen species mediate cardiomyocyte injury in early type 1 diabetes. *Am J Physiol Cell Physiol*, **302**: 597-604.

MANNA P, PARAMES PC (2012). Impaired redox signaling and mitochondrial uncoupling contributes vascular inflammation and cardiac dysfunction in type 1 diabetes: Protective role of arjunolic acid. *Biochimie*, **94**: 786-797.

MARBER MS, LATCHMAN DS, WALKER JM, YELLON DM (1993). Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*, **88**: 1264–1272.

MAZUMDER PK, O'NEILL BT, ROBERTS MW, BUCHANAN J, YUN UJ, COOKSEY RC, BOUDINA S, ABEL ED (2004). Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes*, **53**: 2366-2374.

MCPHEE SJ, HAMMER GD (2010). Pathophysiology of Disease, 6th Edition., China: Mc Graw Hill.

MELLOR H, PARKER PJ (1998). The extended protein kinase C super-family. *Biochem J*, **332(2)**: 281-292.

MELMED S, POLONSKY KS, LARSEN PR, KRONENBERG HM (2016). Williams Textbook of Endocrinology, 13th Edition., Philadelphia: Elsevier/Saunders. 1371–1435.

METZEN E, BERCHNER-PFANNNSCHMIDT U, STENGEL P, MARXSEN JH, STOLZE I, KLINGER M, HUANG WQ, WOTZLAW C, HELLWIG-BÜRGE T, JELKMANN W, ACKER H, FANDREY J (2003). Intracellular localisation of human HIF-1 α hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci*, **116**:1319–1326.

MIKI T, YUDA S, KOUZU H, MIURA T (2013). Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features. *Heart Fail Rev*, **18(2)**: 149-166.

MILDENBERGER RR, BAR-SHLOMO B, DRUCK MN, JABLONSKY G, MORCH JE, HILTON JD, KENSHOLE AB, FORBATH N, MCLAUGHLIN PR (1984). Clinically unrecognized dysfunction in young diabetic patients. *J Am Coll Cardiol*, **4**: 234-238.

MILKIEWICZ M, HAAS TL (2005). Effect of mechanical stretch on HIF-1 α and MMP-2 expression in capillaries isolated from overloaded skeletal muscles: laser capture microdissection study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **289**: 1315–1320.

MINAMISHIMA YA, MOSLEHI J, PADERA RF, BRONSON RT, LIAO R, KAELEN WG (2009). A feedback loop involving the Phd3 prolyl hydroxylase tunes the mammalian hypoxic response in vivo. *Mol Cell Biol*, **29**: 5729–5741.

MISHRA PK, GIVVIMANI S, CHAVALI V, TYAGI SC (2013). Cardiac matrix: a clue for future therapy. *Biochim Biophys Acta*, **1832(12)**: 2271–2276.

MIYAUCHI Y, JESMIN S, SAKAI S, KAMIYAMA J, SHIMOJO N, RAHMAN A, ISLAM M, ZAEDI S, MAEDA S, MARUYAMA H, MIZUTANI T, HOMMA S, AONUMA K, MIYAUCHI T (2014). Effects of selective endothelin (ET)-A receptor antagonist versus dual ET-A/B receptor antagonist on hearts of streptozotocin-treated diabetic rats. *Life Sciences*, **111**: 6–11.

MOHAVED MR (2007). Diabetes as a risk factor for cardiac conduction defects: a review. *Diabetes Obes Metab*, **9**: 276-281.

MOHAVED MR, HASHEMZADEH M, JAMAL MM (2005). Increased prevalence of third-degree atrioventricular block in patients with type II diabetes mellitus. *Chest*, **200(128)**: 2611-2614.

MOHAVED MR, HASHEMZADEH M, JAMAL MM (2007). Increased prevalence of ventricular fibrillation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Heart Vessels*, **22**: 251-253.

MOLE DR, BLANCHER C, COPLEY RR, POLLARD PJ, GLEADLE JM, RAGOISSIS J, RATCLIFFE PJ (2009). Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem*, **284**: 16767–16775.

MOMOSE M, ABLETSCHAUER C, NEVERVE J, NEKOLLA SG, SCHNELL O, STANDL E, SCHWAIGER M, BENDEL FM (2002). Dysregulation of coronary microvascular reactivity in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **29**: 1675–1679.

MORTIMER EA JR, MONSON RR, MACMAHON B (1977). Reduction in mortality from coronary heart disease in men residing at high altitude. *N Engl J Med*, **296**: 581-585.

MURARKA S, MOHAVED MR (2010). Diabetic Cardiomyopathy. *Journal of Cardiac Failure*, **16(12)**: 971-979.

MURILLO D, KAMGA C, MO L, SHIVA S (2011). Nitrite as a mediator of ischemic preconditioning and cytoprotection. *Nitric Oxide*, **25(2)**: 70–80.

MURKOWSKI FH, JACKSON KK, MANDSAGER R (2006) Alaska Air Medical Escort Training Manual, 4th Edition., Juneau: State of Alaska.

MURRY CE, JENNINGS RB, REIMER KA (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, **74(5)**: 1124–1136.

NAKAYAMA H, MOROZUMI T, NANTO S, SARTONI-D'AMBROSIA G, ARBIQUE D, VONGPATANASIN W, UNGER R, VICTOR RG (2001). Abnormal myocardial free fatty acid utilization deteriorates with morphological changes in the hypertensive heart. *Jpn Circ J*, **65**: 783-787.

NATARAJAN R, SALLOUM FN, FISHER BJ, KUKREJA RC, FOWLER AA (2006). Hypoxia inducible factor-1 activation by prolyl 4-hydroxylase-2 gene silencing attenuates myocardial ischemia reperfusion injury. *Circ Res*, **98**: 133–40.

NEUBAUER S (2007). Mechanisms of disease: the failing heart – an engine out of fuel. *N Engl J Med*, **356**: 1140–1151.

NEUFELD G, COHEN T, GENGRINOVITCH S, POLTORAK Z (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, **13**: 9–22.

NUNODA S, GENDA A, SUGIHARA N, NAKAYAMA A, MIZUNO S, TAKEDA R (1985). Quantitative approach to the histopathology of the biopsied right ventricular myocardium in patients with diabetes mellitus. *Heart Vessels*, **1**: 43–47.

O'TOOLE EA, van KONINGSVELD R, CHEN M, WOODLEY DT (2008). Hypoxia induces epidermal keratinocyte matrix metalloproteinase-9 secretion via the protein kinase C pathway. *J Cell Physiol*, **214**: 47–55.

OCKAILI R, NATARAJAN R, SALLOUM F, FISHER BJ, JONES D, FOWLER AA, KUKREJA RC (2005). HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury: role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **289**: 542–548.

OEHME F, ELLINGHAUS P, KOLKHOF P, SMITH TJ, RAMAKRISHNAN S, HUTTER J, SCHRAMM M, FLAMME I (2002). Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*, **296**: 343–349.

OHASHI H, TAKAGI H, KOYAMA S, OH H, WATANABE D, ANTONETTI DA, MATSUBARA T, NAGAI K, ARAI H, KITA T, HONDA Y (2004). Alterations in expression of angiopoietins and the Tie-2 receptor in the retina of streptozotocin induced diabetic rats. *Mol Vis*, **10**: 608–617.

OOIE T, TAKAHASHI N, NAWATA T, ARIKAWA M, YAMANAKA K, KAJIMOTO M, SHINOHARA T, SHIGEMATSU S, HARA M, YOSHIMATSU H, SAIKAWA T (2003). Ischemia-Induced Translocation of Protein Kinase C-ε Mediates Cardioprotection in the Streptozotocin-Induced Diabetic Rat. *Circ J*, **67**: 955–961.

OPAZO-NAVARRETE A, MITCHELL GS (2014). Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **307**: 1181–1197.

OSAWA T, KATO Y (2005). Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. *Ann N Y Acad Sci*, **1043**: 440–451.

PALMER BF, CLEGG DJ (2014). Oxygen sensing and metabolic homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **397**: 51–58.

PAPAIOANNOU GI, SEIP RL, GREY NJ, KATTEN D, TAYLOR A, INZUCCHI SE, YOUNG LH, CHYUN DA, DAVEY JA, WACKERS FJ, ISKANDRIAN AE, RATNER RE, ROBINSON EC, CAROLAN S, ENGEL S, HELLER GV (2004). Brachial artery reactivity in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria (from the Detection of Ischemia in Asymptomatic Diabetics brachial artery reactivity study). *Am J Cardiol*, **94**: 294–299.

PARK AM, NAGASE H, VINOD KUMAR S, SUZUKI YJ (2007). Acute intermittent hypoxia activates myocardial cell survival signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **292**(2): 751–757.

PARK AM, SUZUKI YJ (2007). Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice. *J Appl Physiol*, **102**: 1806–1814.

PARK JE, KELLER GA, FERRARA N (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Molecular Biology of the Cell*, **4**(12): 1317–1326.

PATTERSON B, FIELDS AV, SHANNON RP (2009). New insights into myocardial glucose metabolism: surviving under stress. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **12**: 424–430.

PATTERSON ML, ATKINSON SJ, KNÄUPER V, MURPHY G (2001). Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP–2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett*, **503**(2–3):158–162.

PETROVA R, YAMAMOTO Y, MURAKI K, YONEKURA H, SAKURAI S, WATANABE T, LI H, TAKEUCHI M, MAKITA Z, KATO I, TAKASAWA S, OKAMOTO H, IMAIZUMI Y, YAMAMOTO H (2002). Advanced glycation endproduct-induced calcium handling impairment in mouse cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, **34**: 1425–1431.

PROCKOP DJ, KIVIRIKKO KI (1995). Collagens: molecular biology, diseases and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem*, **64**: 403–434.

PRZYGODZKI T, TALAR M, WATALA C (2013). COX-2-derived prostaglandins do not contribute to coronary flow regulation in diabetic rats: Distinct secretion patterns of PGI₂ and PGE₂. *European Journal of Pharmacology*, **700**: 86–92.

QIAN X, WANG TN, ROTHMAN VL, NICOSIA RF, TUSZYNSKI GP (1997). Thrombospondin-1 modulates angiogenesis in vitro by up-regulation of matrix metalloproteinase- 9 in endothelial cells. *ExpCell Res*, **235**: 403–412.

RABINOWITZ MH (2013). Inhibition of Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Domain Oxygen Sensors: Tricking the Body into Mounting Orchestrated Survival and Repair Responses. *J Med Chem*, **56**: 9369–9402.

RADAK Z, LEE K, CHOI W, SUNOO S, KIZAKI T, OH-ISHI S, SUZUKI K, TANIGUCHI N, OHNO H, ASANO K (1994). Oxidative stress induced by intermittent exposure at a simulated altitude of 4000 m decreases mitochondrial superoxide dismutase content in soleus muscle of rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, **69**: 392–395.

RAJAMANI U, ESSOP MF (2010). Hyperglycemia-mediated activation of the hexosamine biosynthetic pathway results in myocardial apoptosis. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, **299**(1): 139–147.

RAMOS DA, KRUGER H, MURO M, ARIAS-STELLA J (1967). Patologia del hombre nativo de las grandes alturas: investigacion de las causas de muerte en 300 autopsias. *Bol Of Sanit Panam*, **62**: 497–501.

RAVINGEROVA T, STETKA R, PANCZA D, ULICNA O, ZIEGELHÖFFER A, STYK J (2000). Susceptibility to Ischemia-Induced Arrhythmias and the Effect of Preconditioning in the Diabetic Rat Heart. *Physiol Res*, **49**: 607-616.

REES DA, ALCOLADO JC (2005). Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med*, **22**: 359–370.

REGAN TJ, LYONS MM, AHMED SS, LEVINSON GE, OLDEWURTEL HA, AHMAD MR, HAIDER B (1977). Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. *J Clin Invest*, **60**: 884-899.

RIVA E, ANDREONI G, BIANCHI R, LATINI R, LUVARA G, JEREMIC G, TRAQUANDI C, TUCCINARDI L (1998). Changes in Diastolic Function and Collagen Content in Normotensive and Hypertensive Rats With Long-Term Streptozotocin-Induced Diabetes. *Pharmacological Research*, **37**(3): 233-240.

ROCHA S (2007). Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci*, **32**: 389–397.

ROSEN P, BALLHAUSEN T, STOCKKLAUSER K (1996). Impairment of endothelium dependent relaxation in the diabetic rat heart: mechanisms and implications. *Diabetes Res Clin Pract*, **31**: 143–155.

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

RYBNIKOVA E, SAMOILOV M (2015). Current insights into the molecular mechanisms of hypoxic pre- and post conditioning using hypobaric hypoxia. *Frontiers in Neuroscience*, **9**: 1-11.

SALCEDA S, CARO J (1997). Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox induced changes. *J Biol Chem*, **272**: 22642–22647.

SARAIVA RM, MINHAS KM, ZHENG M, PITZ E, TREUER A, GONZALEZ D, SCHULERI KH, VANDEGAER KM, BAROUCH LA, HARE JM (2006). Reduced neuronal nitric oxide synthase expression contributes to cardiac oxidative stress and nitroso-redox imbalance in ob/ob mice. *Nitric Oxide*, **16**: 331–338.

SASSO FC, TORELLA D, CARBONARA O, ELLISON GM, TORELLA M, SCARDONE M, MARRA C, NASTI R, MARFELLA R, COZZOLINO D, INDOLFI C, COTRUFO M, TORELLA R, SALVATORE T (2005). Increased vascular endothelial growth factor expression but impaired vascular endothelial growth factor receptor signaling in the myocardium of type 2 diabetic patients with chronic coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol*, **46**: 827–834.

SEDDON M, LOOI YH, SHAH AM (2007). Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart*, **93**(8): 903–907.

SELLERS DJ, CHESS-WILLIAMS R (2001). The effect of streptozotocin-induced diabetes on cardiac beta-adrenoceptor subtypes in the rat. *J Auton Pharmacol*, **21**(1): 15-21.

SEMENZA GL (2009). Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology*, **24**: 97–106.

SEMENZA GL (2012) Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*, **33**: 207–214.

SEMENZA GL, WANG GL (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, **12**: 5447–5454.

SEMENZA GL, AGANI F, BOOTH G, FORSYTHE J, IYER N, JIANG BH, LEUNG S, ROE R, WENER C, YU A (1997). Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int*, **51**: 553–555.

SHARMA S, ADROUGE JV, GOLFMAN L, URAY I, LEMM J, YOUKER K, NOON GP, FRAZIER OH, TAEGTMEYER H (2004). Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J*, **18**: 1692-1700.

SHATILO VB, KORKUSHKO OV, ISCHUK VA, DOWNEY HF, SEREBROVSKAYA TV (2008). Effects of intermittent hypoxia training on exercise performance, hemodynamics, and ventilation in healthy senior men. *High Alt Med Biol*, **9**(1):43–52.

SHINGLETON WD, HODGES DJ, BRICK P, CAWSTON TE (1996). Collagenase: a key enzyme in collagen turnover. *Biochem Cell Biol*, **74**: 759-775.

SHIZUKUDA Y, MALLET RT, LEE SC, DOWNEY HF (1992). Hypoxic preconditioning of ischaemic canine myocardium. *Cardiovasc Res*, **26**(5): 534–542.

SIQUES P, LÓPEZ DE PABLO AL, BRITO J, ARRIBAS SM, FLORES K, ARRIAZA K, NAVEAS N, GONZÁLEZ MC, HOORNTJE A, LEÓN-VELARDE F (2014). Nitric oxide and superoxide anion balance in rats exposed to chronic and long term intermittent hypoxia. *Biomed Res In*, **2014**: 1-11.

STEINER S, SCHUELLER PO, SCHULZE V, STRAUER BE (2010). Occurrence of coronary collateral vessel s in patients with sleep apnea and total coronary occlusion. *Chest*, **137**(3):516–520.

STRNISKOVA M, BARANCIK M, NECKAR J, RAVINGEROVA T (2003). Mitogen-Activated Protein Kinases in the Acute Diabetic Myocardium. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **249**: 59–65.

SUAREZ J, SCOTT B, DILLMANN WH (2008). Conditional increase in SERCA2a protein is able to reverse contractile dysfunction and abnormal calcium flux in established diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **295**: 1439–1445.

SUBRAMANIAN V, KRISHNAMURTHY P, SINGH K, SINGH M (2006). Lack Of Osteopontin Improves Cardiac Function in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **292**: 673–683.

SUNG MM, HAMZA SM, DYCK JRB (2015). Myocardial Metabolism in Diabetic Cardiomyopathy: Potential Therapeutic Targets. *Antioxidants & Redox Signaling*, **22**(17): 1606-1630.

SYROVY I, HODNY Z (1992). Nonenzymatic glycosylation of myosin: effects of diabetes and ageing. *Gen Physiol Biophys*, **11**: 301-307.

SZABO C (2002). PARP as a drug target for the therapy of diabetic cardiovascular dysfunction. *Drug News Perspect*, **15**: 197-205.

SZCZEPANIAK LS, DOBBINS RL, METZGER GJ, SARTONI-D'AMBROSIA G, ARBIQUE D, VONGPATANASIN W, UNGER R, VICTOR RG (2003). Myocardial triglycerides and systolic function in humans: in vivo evaluation by localized proton spectroscopy and cardiac imaging. *Magn Reson Med*, **49**: 417-423.

TAKEDA K, COWAN A, FONG GH (2007). Essential role for prolyl hydroxylase domain protein 2 in oxygen homeostasis of the adult vascular system. *Circulation*, **116**: 774-781.

TAKEDA N, MAEMURA K, IMAI Y, HARADA T, KAWANAMI D, NOJIRI T, MANABE I, NAGAI R (2004). Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ Res*, **95**: 146-153.

TAMADA A, HATTORI Y, HOUZEN H, YAMADA Y, SAKUMA I, KITABATAKE A, KANNO M (1998). Effects of beta-adrenoceptor stimulation on contractility, $[Ca^{2+}]_i$, and Ca^{2+} current in diabetic rat cardiomyocytes. *Am J Physiol*, **274**: 1849-1857.

TAMARAT R, SILVESTRE JS, HUIJBERTS M, BENESSIANO J, EBRAHIMIAN TG, DURIEZ M, WAUTIER MP, WAUTIER JL, LEVY BI (2003). Blockade of advanced glycation end-product formation restores ischemia-induced angiogenesis in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci*, **100**: 8555-8560.

TAN KC, CHOW WS, AI VH, LAM KS (2002). Effects of angiotensin II receptor antagonist on endothelial vasomotor function and urinary albumin excretion in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetes Metab Res Rev*, **18**: 71-76.

TANIMOTO K, MAKINO Y, PEREIRA T, POELLINGER L (2000). Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J*, **19**: 4298-4309.

TARABOLETTI G, GAROFALO A, BELOTTI D, DRUDIS T, BORSOTTI P, SCANZIANI E, BROWN PD, GIAVAZZI R (1995). Inhibition of angiogenesis and murine hemangioma growth by batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases. *J Natl Cancer Inst*, **87**: 293-298.

TAYE A, ABOUZIED MM, MOHAFAEZ OMM (2013) Tempol ameliorates cardiac fibrosis in streptozotocin-induced diabetic rats: role of oxidative stress in diabetic cardiomyopathy. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **386**: 1071-1080.

TEKIN D, DURSUN AD, XI L (2010). Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection. *Acta Pharmacologica Sinica*, **31**: 1085-1094.

THANGARAJAH H, YAOB D, CHANGA EI, SHIA Y, JAZAYERIA L, VIALA IN, GALIANOA RD, DUB XL, GROGANA R, GALVEZA MG, JANUSZYKA M, BROWNLEEB M, GURTNERA GC (2009). The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *PNAS*, **106**(32): 13505-13510.

THIRUNAVUKKARASU M, SELVARAJU V, DUNNA NR, FOYE JLC, JOSHI M, OTANI H, MAULIK N (2013). Simvastatin treatment inhibits hypoxia inducible factor 1- α -(HIF-1 α)-prolyl-4-hydroxylase 3 (PHD-3) and increases angiogenesis after myocardial infarction in streptozotocin-induced diabetic rat. *International Journal of Cardiology*, **168**: 2474–2480.

TROST SU, BELKE DD, BLUHM WF, MEYER M, SWANSON E, DILLMANN WH (2002). Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*, **51**: 1166-1171.

TSAI SH, HUANG PH, HSU YJ, PENG YJ, LEE CH, WANG JC, CHEN JW, LIN SJ (2016). Inhibition of hypoxia inducible factor-1 α attenuates abdominal aortic aneurysm progression through the down-regulation of matrix metalloproteinases. *Sci Rep*, **6(28612)**: 1-11

TSCHOPE C, WALTHER T, KONIGER J, SPILLMAN F, WESTERMANN D, ESCHER F, PAUSCHINGER M, PESQUERO JB, BADER M, SCHULTHEISS HP, NOUTSIAS M (2004). Prevention of cardiac fibrosis and left ventricular dysfunction in diabetic cardiomyopathy in rats by transgenic expression of the human tissue kallikrein gene. *FASEB J*, **18**: 828-835.

TUCKERMAN JR, ZHAO Y, HEWITSON KS, TIAN YM, PUGH CW, RATCLIFFE PJ, MOLE DR (2004). Determination and comparison of specific activity of the HIF-prolyl hydroxylases. *FEBS Lett*, **576(1-2)**: 145-150.

TUNCAY E, SEYMEN AA, TANRIVERDI E, YARAS N, TANDOĞAN B, ULUSU NN, TURAN B (2007). Gender Related Differential Effects of Omega-3E Treatment on Diabetes-Induced Left Ventricular Dysfunction. *Mol Cell Biochem*, **304**: 255–263.

TUNCAY E, OKATAN EN, VASSORT G, TURAN B (2013). β -Blocker Timolol Prevents Arrhythmogenic Ca²⁺ Release and Normalizes Ca²⁺ and Zn²⁺ Dyshomeostasis in Hyperglycemic Rat Heart. *PLoS ONE*, **8(7)**: e71014. doi:10.1371/journal.pone.0071014.

TURKO IV, LI L, AULAK KS, STUEHR DJ, CHANG YJ, MURAD F (2003). Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart. Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes. *J Biol Chem*, **278**: 33972-33977.

TUO Q, ZENG H, STINNETT A, YU H, ASCHNER JL, LIAO DF, CHEN JX (2008). Critical role of angiopoietins/Tie-2 in hyperglycemic exacerbation of myocardial infarction and impaired angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **294**: 2547–2557.

UEMURA S, MATSUSHITA H, LI W, GLASSFORD AJ, ASAGAMI T, LEE KH, HARRISON DG, TSAO PS (2001). Diabetes Mellitus Enhances Vascular Matrix Metalloproteinase Activity Role of Oxidative Stress. *Circ Res*, **88**: 1291-1298.

UNGER RH (2002). Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med*, **53**: 319-336.

VERGES S, CHACAROUN S, RIBOUT-GODIN D, BAILLIEUL S (2015). Hypoxic conditioning as a new therapeutic modality. *Front Pediatr*, **3(58)**: 1-14.

VIAPPIANI S, NICOLESCU AC, HOLT A, SAWICKI G, CRAWFORD BD (2009). Activation and modulation of 72 kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. *Biochem Pharmacol*, **77**: 826–834.

VOORS AW, JOHNSON WD (1979). Altitude and arteriosclerotic heart disease mortality in white residents of 99 of the 100 largest cities in the United States. *J Chronic Dis*, **32**: 157-162.

WAKASAKI H, KOYA D, SCHOEN FJ, JIROUSEK MR, WAYS DK, HOIT BD, WALSH RA, KING GL (1997). Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 9320-9325.

WALD M, PASCUAL J, STERIN-BORDA L (1989). Role of thromboxanes in alterations of the diabetic beta-adrenergic system. *Biochem Pharmacol*, **38(19)**: 3347-3355.

WALTENBERGER J, MAYR U, PENTZ S, HOMBACH V (1996). Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation*, **94(7)**: 1647-1654.

WALTER RM JR, URIU-HARE JY, OLIN KL, OSTER MH, ANAWALT BD, CRITCHFIELD JW, KEEN CL (1991). Copper, zinc, manganese and magnesium status and complications of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **14**: 1050-1056.

WANG GL, SEMENZA GL (1993). Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*, **268**: 21513-21518.

WANG W, SCHULZE CJ, SUAREZ-PINZON WL, DYCK JR, SAWICKI G (2002) Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation*, **106**: 1543-1549.

WEBER KT, BRILLA CG, JANICKI JS (1993). Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovas Res*, **27**: 341-348.

WENGER RH, STIEHL DP, CAMENISCH G (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*, **2005(306)**: 1-12.

WEST JB, SCHOENE RB, MILLEDGE JS (2007). High Altitude Medicine and Physiology 4th Edition., Londra: Hodder Arnold.

WIENER CM, BOOTH G, SEMENZA GL (1996). In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*, **225**: 485-488.

WILLAM C, MAXWELL PH, NICHOLS L, LYGATE C, TIAN YM, BERMHARDT W, WIESENER M, RATCLIFFE PJ, ECKARDT KU, PUGH CW (2006). HIF prolyl hydroxylases in the rat; organ distribution and changes in expression following hypoxia and coronary artery ligation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **41**: 68-77.

WOLD LE, CEYLAN AF, REN J (2005). Oxidative stress and stress signalling: menace of diabetic cardiomyopathy. *Acta Pharmacol Sin*, **26**: 908-917.

WU S, NISHIYAMA N, KANO MR, MORISHITA Y, MIYAZONO K, ITAKA K, CHUNG UI, KATAOKA K (2008). Enhancement of angiogenesis through stabilization of hypoxia-inducible factor-1 by silencing prolyl hydroxylase domain-2 gene. *Mol Ther*, **16**: 1227-1234.

XI L, TAHER M, YIN C, SALLOUM F, KUKREJA RC (2004). Cobalt chloride induces delayed cardiac preconditioning in mice through selective activation of HIF-1 α and AP-1 and iNOS signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **287**: 2369–2375.

XIA Y, GONG L, LIU H, LUO B, LI B, LI R, LI B, LV M, PAN J, AN F (2015). Inhibition of prolyl hydroxylase 3 ameliorates cardiac dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **403**: 21–29.

XIAO H, GU Z, WANG G, ZHAO T (2013). The Possible Mechanisms Underlying the Impairment of HIF-1 α Pathway Signaling in Hyperglycemia and the Beneficial Effects of Certain Therapies. *Int J Med Sci*, **10**: 1412–1421.

XUE W, CAI L, TAN Y, THISTLETHWAITE P, KANG YJ, LI X, FENG W (2010). Cardiac-Specific Overexpression of HIF-1 Prevents Deterioration of Glycolytic Pathway and Cardiac Remodeling in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Am J Pathol*, **177**(1): 97–105.

YARAS N, BILGINOGLU A, VASSORT G, TURAN B (2007). Restoration of diabetes-induced abnormal local Ca²⁺ release in cardiomyocytes by angiotensin II receptor blockade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **292**: 912–920.

YARAS N, SARIAHMETOGLU M, BILGINOGLU A, AYDEMIR-KOKSOY A, ONAY-BESIKCI A, TURAN B, SCHULZ R (2008). Protective action of doxycycline against diabetic cardiomyopathy in rats. *British Journal of Pharmacology*, **155**: 1174–1184.

YAROM R, ZIRKIN H, STAMMLER G, ROSE AG (1992). Human coronary microvessels in diabetes and ischaemia. Morphometric study of autopsy material. *J Pathol*, **166**: 265–270.

YAZAKI Y, ISOBE M, TAKAHASHI W, KITABAYASHI H, NISHIYAMA O, SEKIGUCHI M, TAKEMURA T (1999). Assessment of myocardial fatty acid metabolic abnormalities in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy using 123i bmipp spect: correlation with clinicopathological findings and clinical course. *Heart*, **81**: 153–159.

YILDIRIM SS, AKMAN D, CATALUCCI D, TURAN B (2013). Relationship between downregulation of miRNAs and increase of oxidative stress in the development of diabetic cardiac dysfunction: junctin as a target protein of miR-1. *Cell Biochem Biophys*, **67**(3): 1397–1408.

YILMAZ S, CANPOLAT U, AYDOGDU S, ABBOUD HE (2015). Diabetic Cardiomyopathy; Summary of 41 Years. *Korean Circ J*, **45**(4): 266–272.

YING J, SHAROV V, XU S, JIANG B, GERRITY R, SCHONEICH C (2008). Cysteine-674 oxidation and degradation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase in diabetic pig aorta. *Free Radic Biol Med*, **45**(6): 756–762.

YOON Y, UCHIDA S, MASUO O, CEJNA M, PARK JS, GWON HC, KIRCHMAIR R, BAHLMAN F, WALTER D, CURRY C, HANLEY A, ISNER JM, LOSORDO DW (2005). Progressive Attenuation of Myocardial Vascular Endothelial Growth Factor Expression Is a Seminal Event in Diabetic Cardiomyopathy. *Circulation*, **111**:2073–2085.

YU J, FEI J, AZAD J, GONG M, LAN Y, CHEN G (2012). Myocardial Protection by Salvia miltiorrhiza Injection in Streptozotocin induced Diabetic Rats through Attenuation of Expression of

Thrombospondin-1 and Transforming Growth Factor- β 1. *The Journal Of International Medical Research*, **40**: 1016-1024.

YUN Z, LIN Q, GIACCIA AJ (2005). Adaptive myogenesis under hypoxia. *Molecular and Cellular Biology*, **25**(8): 3040–3055.

ZEYDANLI EN, TURAN B (2009). Omega-3E treatment regulates matrix metalloproteinases and prevents vascular reactivity alterations in diabetic rat aorta. *Can J Physiol Pharmacol*, **87**: 1-11.

ZEYDANLI EN, BILGINOGLU A, TANRIVERDI E, GURDAL H, TURAN B (2010). Selenium restores defective beta-adrenergic receptor response of thoracic aorta in diabetic rats. *Mol Cell Biochem*, **338**: 191–201.

ZHANG DX, FRYER RM, HSU AK, ZOU AP, GROSS GJ, CAMPBELL WB, LI PL (2001). Production and metabolism of ceramide in normal and ischemic reperfused myocardium of rats. *Basic Res Cardiol*, **96**: 267-274.

ZHANG L, PARRATT JR, BEASTALL GH, PYNE NJ, FURMANA BL (2002). Streptozotocin diabetes protects against arrhythmias in rat isolated hearts: role of hypothyroidism. *European Journal of Pharmacology*, **435**: 269– 276.

ZHANG Y, ZHONG N, ZHU HF, ZHOU ZN (2000). Antiarrhythmic and antioxidative effects of intermittent hypoxia exposure on rat myocardium. *Sheng Li Xue Bao*, **52**(2): 89-92.

ZHONG N, ZHANG Y, ZHU HF, WANG JC, FANG QZ, ZHOU ZN (2002). Myocardial capillary angiogenesis and coronary flow in ischemia tolerance rat by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. *Acta Pharmacol Sin*, **23**(4): 305–310.

ZIEMAN SJ, KASS DA (2004). Advanced glycation endproduct crosslinking in the cardiovascular system: potential therapeutic target for cardiovascular disease. *Drugs*, **64**: 459-470.

EK 1: Etik Kurul Kararı



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

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

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

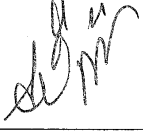
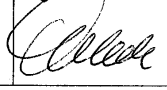
Üniversitemiz Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Metin Baştuğ ve Prof.Dr.Hakan Fıçırcılar'ın araştırma yürütücüsü oldukları, Prof.Dr.Metin Baştuğ, Prof.Dr.Hakan Fıçırcılar, Prof.Dr.Belma Turan, Uzm.Dr.Ali Doğan Dursun, Araş.Gör.Dr.Ayhan Tanyeli, Araş.Gör.Dr.Derya Güzel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

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

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

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 - 50 Faks: 0 (312) 212 60 49

EK 1: Etik Kurul Kararı (devamı)

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

ÖZGEÇMİŞ

I – Bireysel Bilgiler

Adı: Fırat
Soyadı: AKAT
Doğum yeri ve tarihi: Ankara, 1985
Uyruğu: TC
Medeni Durumu: Evli
Askerlik Durumu: Yapmış
İletişim Adresi ve Telefonu: Orhan Kemal Cad. 1890. Sokak 21/17
Beşikkaya / ANKARA, +90 (507) 688 46 21

II – Eğitimi

Doktora AÜTF Fizyoloji ABD (2011-Devam Ediyor)
Yüksek Lisans AÜTF Fizyoloji ABD (2008-2010)
Lisans HÜ Biyoloji Bölümü (2003-2008)
Yabancı Dil: YDS: 85

III – Ünvanları

Biyolog, Araştırma Görevlisi

IV – Mesleki Deneyim

Araştırma Görevlisi AÜTF Fizyoloji ABD (2011-Devam Ediyor)

VI – Bilimsel İlgi Alanları

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

A1. Güzel D, Dursun AD, Fıçıcılar H, Tekin D, Tanyeli A, Akat F, Topal Çelikkın F, Sabuncuoğlu B, Baştuğ M. Effect of intermittent hypoxia on the cardiac HIF-1/VEGF pathway in experimental type 1 diabetes mellitus. *Anatol J Cardiol.* 2016 Feb;16(2):76-83.

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler :

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler :

B1. Akat F, Akın İM, Dursun AD, Okulu E, Atasay B, Fıçıcılar H, Baştuğ M, Arsan S. The protective effect of kefir prophylaxis in the experimental necrotizing

enterocolitis model. FEBS 2011; Proceedings of Turkish-FEPS Physiology Congress Abstract CD. 2011 September 3-7; Yeditepe University, İstanbul, Turkey. (PC285).

B2. Dursun AD, **Akat F**, Tanyeli A, Baştuğ M, Fıçıcılar H, Güzel D, Turan B. An investigation on the effects of intermittent hypoxia in streptozotocin-induced diabetic cardiac function. 6th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels. Isparta, Turkey, 24-27 May, 2016.

B3. Oral Y, Caliskan H, **Akat F**, Zaloglu, N. Gur S. Treatment With Anti-Convulsant Pregabalin At High Dosage Protects The Penile Erectile Responses In Rat Model Of Acute Anxiety. 18th Congress of the European Society for Sexual Medicine. Feb 4, 2016 - Feb 6, 2016. (PS-04-013) *J Sex Med* 2016;13:S88-94.

B4. Gokçe E, Koç E, Dursun AD, Billur D, **Akat F**, Can B. Effects of eccentric exercise on different slopes. Joint Meeting of The Federation of European Physiological Societies and The French Physiological Society June 29th-July 1st 2016. Paris, France (P0-092). *Acta Physiol* 2016, 217 (Suppl. 708), 3–158. p69.

B5. Dursun AD, Caliskan H, Tatar Y, Zaloglu N, **Akat F**, Bastuğ M, Fıçıcılar H Effects of exercise training on anxiety in diabetic rats. Joint Meeting of The Federation of European Physiological Societies and The French Physiological Society June 29th-July 1st 2016. Paris, France (PO.094) *Acta Physiol* 2016, 217 (Suppl. 708), 3–158. p69.

B6. Caliskan H, Zaloglu N, Dursun AD, **Akat F**. Pregabalin have dose responsible anxiolytic effects on animal anxiety tests. Joint Meeting of The Federation of European Physiological Societies and The French Physiological Society June 29th-July 1st 2016. Paris, France (PO.138) *Acta Physiol* 2016, 217 (Suppl. 708), 3–158. p88.

B7. Caliskan H, Zaloglu N, Dursun AD, **Akat F**. Pregabalin alters climbing behaviour in forced swimming test. Joint Meeting of The Federation of European Physiological Societies and The French Physiological Society June 29th-July 1st 2016. Paris, France (PO.151) *Acta Physiol* 2016, 217 (Suppl. 708), 3–158 p93.

B8. Çalışkan H, **Akat F**, Zaloğlu N. Zorunlu Yüzme Testindeki Adaptasyon Davranışları. 2.IVEK Uluslar arası İlaç ve Eczacılık Kongresi, 27-29 Kasım 2015. Haliç Kongre Merkezi, İstanbul (P108).

C. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

C1. **Akat F**, Kalaycıoğlu C. Nikotin Dönme Yönü Tercihi ve Uzaysal Görsel Dikkat Üzerine Etkisi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2012; 65 (2): 83-90 (Yüksek Lisans Tezinin Yayımıdır).

D. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

D1. Akat F, Kalaycıoğlu C, Arı F, NalçacıE. Nikotinin Dönme Yönü Tercihi ve Uzaysal Görsel Dikkat Üzerine Etkisi. 2010; Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 36. Ulusal Fizyoloji Kongresi. 14-17 Eylül 2010 Edirne; P20.

D2. Ertekin K, **Akat F**, Dursun AD, Baştuğ M, Fıçıcılar H. Yüksek fruktozlu mısır şurubu (HFCS-55) ve sakkaroz çözeltisi ile beslenen sıçanlarda glukoz ve lipid metabolizmasındaki değişimler. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 39. Ulusal Kongresi Bildiri Özet Kitabı; 10-14 Eylül 2013; Hacettepe Üniversitesi, Ankara. 2013;Bildiri no:P028:syf.100. (poster bildirisi)

D3.Dursun AD, Ertekin K, **Akat F**, Baştuğ M, Fıçıcılar H, Erdoğan BD. Yüksek fruktozlu mısır şurubu ve sakkaroz çözeltisi ile beslenen sıçanlarda metabolik değişimler. Türkiye Gıda ve İçecek Sanayi Dernekleri Federasyonu TGDF Gıda Kongresi 2013 Poster Bildiri Özetleri Kitabı; 12-14 Kasım 2013; Sueno Hotels Beach Side, Antalya. 2013; syf.86. (poster bildirisi)

D4. Dursun AD, **Akat F**, Ardıç M, Baştuğ M, Fıçıcılar H. Sakkaroz Çözeltisi Veya Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu İle 6 Ay Süreyle Beslenen Yavru Sıçanlarda Metabolik Değişimler (Poster bildirisi) Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi 2-6 Eylül 2014 Erciyes Üniversitesi, Kayseri. (P027)

VII – Bilimsel Etkinlikleri

Katıldığı Projeler:

- 1) Streptozotosin ile indüklenen diyabetik kardiyomiyopatide aralıklı (intermittent) hipoksinin etkilerinin fonksiyonel ve moleküler tekniklerle incelenmesi (A.Ü. BAP Koordinasyon Birimi, Kod No: 13B3330002, yardımcı araştırmacı, 14.03.2013-14.03.2015, yürütücü: Prof. Dr. Metin Baştuğ, bütçe: 85.974,00 TL). Tamamlandı.

Burs - Ödül:

- 1) Erasmus Hayat Boyu Öğrenme Programı Staj Hareketliliği ile, Junior Research Group Signal Transduction, Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf, Almanya'da çalışmalarda bulunmuştur (2013).

Katıldığı Kongre ve Bilimsel Toplantılar:

Üniversite Konseyleri Derneği III. Evrim Bilim ve Eğitim Sempozyumu (tarih), Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul/Türkiye

Turkish-FEPS PhysiologyCongress 3-7 Eylül 2011; Yeditepe Üniversitesi, İstanbul/Türkiye

TFBD 36.Ulusal Fizioloji Kongresi 14-17 Eylül 2010; Trakya Üniversitesi, Edirne/Türkiye

8.Ulusal Sinirbilimleri Kongresi 18-22 Nisan 2009; Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Bolu/Türkiye

9. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi 13-17 Nisan 2010; Yeditepe Üniversitesi, İstanbul/Türkiye

Katıldığı Kurslar

Yüce Bilimler Akademisi Aptech Bilgisayar Programcılığı Kursu (2007)

VIII. Ulusal Sinirbilimleri Kongresi, Bolu: Stereotaksi Kursu (2009)

X.Ulusal Sinirbilimler Kongresi, İstanbul: Elektrofizyoloji Kursu (2010)

Deney Hayvanları Kursu

VIII-Diğer Bilgiler