



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**DİYABET KAYNAKLI KALP FONKSİYON
BOZUKLUĞUNDA HÜCRE İÇİ İYON DERİŞİMLERİ
İLE FOSFODİESTERAZLARIN AKTİVİTELERİ
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN TİP 2 OBEZ-SIÇAN
MODELİNDE İNCELENMESİ**

Esmâ Nur OKATAN

**BİYO FİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. Belma TURAN**

2015-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİYABET KAYNAKLI KALP FONKSİYON
BOZUKLUĞUNDA HÜCRE İÇİ İYON DERİŞİMLERİ
İLE FOSFODİESTERAZLARIN AKTİVİTELERİ
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN TİP 2 OBEZ-SIÇAN
MODELİNDE İNCELENMESİ**

Esmâ Nur OKATAN

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof.Dr. BELMA TURAN**

2015-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyofizik Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.
Tez Savunma Tarihi: 20/04/2015



Prof. Dr. NUHAN PURALI
Hacettepe Üniversitesi Tıp Faköltesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. BELMA TURAN
Ankara Üniversitesi Tıp Faköltesi
Danışman



Prof. Dr. HAKAN GÜRDAL
Ankara Üniversitesi Tıp Faköltesi
TİK Üyesi



Prof. Dr. CÜNEYT GÖKSOY
Gölhane Askeri Tıp Akademisi Tıp Faköltesi
Üye



Doç.Dr. BABÜR ŞAHİNOĞLU
Hacettepe Üniversitesi Tıp Faköltesi
Üye

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Metabolik Sendrom	1
1.2. Yüksek-Sükroz Diyeti ile Metabolik Sendrom Deney Modelinin Oluşturulması	2
1.3. Metabolik Sendrom ile Oluşan Kardiyak Fonksiyon Bozukluğunda Rol Alan Moleküler Mekanizmalar	7
1.5. Fosfodiesterazların Kalpteki İfade Düzeyleri ve Modülasyonu	12
1.6. Fosfodiesterazların Kardiyak Fonksiyon ve Ca^{2+} Homeostazı Üzerine Etkileri	14
1.7. Diyabet Modellerinde Fosfodiesteraz Aktiviteleri	17
1.8. Çalışmanın Amacı	18
2. GEREÇ VE YÖNTEM	19
2.1. Sıçanlarda Metabolik Sendrom Deney Modelinin Oluşturulması	20
2.2. Sıçanlarda Metabolik Sendrom Deney Modelinin Oluşumunun Doğrulanması	20
2.2.1. Oral Glukoz Toleransının ve İnsulin Direncinin Ölçülmesi	21
2.2.2. Serum Trigliserit Düzeylerinin Ölçülmesi	22
2.2.3. Hemodinamik Parametrelerin Ölçümü	22
2.2.4. Serum Leptin ve Ghrelin Hormon Protein Düzeylerinin Western-Blot Tekniği ile Ölçülmesi	23
2.3. Metabolik Sendromlu Sıçanlarda Sistemik Oksidan ve Antioksidan Seviyelerinin Ölçülmesi	23
2.4. Yüksek Sükroz ile Beslenen Sıçan Kalplerinin Histolojik Değerlendirmesi	24
2.5. İzole organ çalışmaları: Sol Ventrikül İçi Basınç Ölçümü	25
2.6. İzole doku çalışmaları: Papiller Kası İzometrik Kasılmalarının Ölçülmesi	26
2.7. Kardiyomiyositlerin İzolasyonu	27
2.8. L-tipi Ca^{2+} Kanal Akımlarının Ölçümü	28
2.9. Hücre İçi Global Ca^{2+} Değişimlerinin (Transientlerinin) Ölçümü	28
2.10. Dinlenme Durumundaki Kardiyomiyositlerde Lokal Ca^{2+} Salınımlarının (Ca^{2+} spark) Ölçülmesi	30

2.11. Sarkoplazmik Retikulum Ca^{2+} Salma ve Geri Alma Fonksiyonlarının Ölçülmesi	31
2.12. Western-blot Tekniği ile Protein Seviyesi Ölçümleri	32
2.13. cAMP Ölçümü	34
2.14. İstatistiksel Analizler	35
2.15. Kullanılan Kimyasallar	36
3. BULGULAR	37
3.1. Sıçanlarda Deneysel Metabolik Sendrom (MetS) Oluşturulması	37
3.1.1. Deney Hayvanları ile İlgili Genel Parametreler	37
3.1.2. Sıçanlarda Deneysel Metabolik Sendrom Gerçekleşmesinin Doğrulanması	38
3.1.3. Metabolik Sendrom Gelişmiş Sıçanlarda Sistemik Oksidatif Stresin Artışı	41
3.1.4. Kalp Dokularında Histolojik İncelemeler	42
3.2. Metabolik Sendrom Gelişmiş Sıçanlarda Kalbin Mekanik Fonksiyonu	44
3.2.1. İzovolumetrik Sol Ventrikül İçi Basınç Değerleri	44
3.2.2. Papiller Kas İzometrik Kasılma Değerleri	45
3.3. Metabolik Sendrom Gelişmiş Sıçan Kardiyomiyositlerinde Hücre İçi Ca^{2+} Homeostazı	46
3.3.1. L-tipi Ca^{2+} Kanal Akımları	46
3.3.2. Metabolik Sendrom Gelişmiş Sıçan Kardiyomiyositlerinde Hücre İçi Global Ca^{2+} Değişimleri (Transientleri)	46
3.3.2. Metabolik Sendromlu Sıçan Kardiyomiyositlerinde Lokal Ca^{2+} Salınım (Spark) Parametreleri	48
3.3.3. Metabolik Sendromlu Sıçan Kardiyomiyositlerinde Sarkoplazmik Retikulum (SR) Ca^{2+} Salma ve Geri Alma Fonksiyonları	49
3.4. Western-blot Bulguları	53
3.4.1. Metabolik Sendromlu Sıçan Kalp Dokusunda Sarkoplazmik Retikulum Ca^{2+} -Salınım ve Ca^{2+} -Geri Alınımında Rol Alan Protein Miktarları	53
3.4.2. Metabolik Sendromlu Sıçan Kalp Dokusunda Ryanodin Reseptör (RyR2) Fosforilasyonunda Rol Alan Kinaz ve Fosfatazlar	55
3.5. MetS Durumunda Fosfodiesteraz (PDE) Protein Seviyeleri	57
3.7. PDE İnhibitörlerinin Papiller Kas Kasılması Üzerine Etkileri	59
3.8. PDE İnhibitörlerinin Metabolik Sendromlu Sıçan Kardiyomiyositlerinde Ölçülen Global Ca^{2+} Değişimleri Üzerine Etkileri	63
3.9. PDE İnhibitörlerinin Kardiyomiyositlerde Ca^{2+} Homeostazından Sorumlu Protein Fosforilasyonları Üzerine Etkileri	66
4. TARTIŞMA	69
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	81
ÖZET	84

SUMMARY	85
KAYNAKLAR	86
ÖZGEÇMİŞ	99

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının danışmanlığını üstlenen, bilgi ve deneyimleriyle kişisel ve akademik gelişimime katkı sağlayan Sayın Hocam Prof. Dr. Belma Turan'a teşekkür ederim.

Tez izleme komite üyeleri Prof. Dr. Mehmet Uğur ve Prof. Dr. Hakan Gürdal'a değerli eleştirileri ve katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Deneysel ve teorik sorularıma verdikleri eğitici yanıtlarla çalışmalarımı daha iyi yapmama katkı sağlayan Prof. Dr. Ogun Onaran, Prof. Dr. Özlem Uğur, Prof. Dr. Can Akçalı, Prof. Dr. Emine Demirel Yılmaz, Doç. Dr. Kemal Sayar ve Doç. Dr. Burak Kandilci'ye teşekkür ederim.

Biyofizik AnaBilim Dalında verimli ve keyifli bir çalışma ortamı oluşturmamıza katkı sağlayan bütün çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bu uzun ve zorlu süreçte her zaman yanımda olan sevgili eşim Dr. Murat Okatan'a ve sevgili aileme çok teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

$[Ca^{+2}]_i$	Hücre içi serbest Ca^{+2} konsantrasyonu
ATP	Adenozin trifosfat
CaMKII	Kalsiyum kalmodulin kinaz II
cAMP	Siklik adenosin monofosfat
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
DT ₅₀	Yarı gevşeme süresi
FKBP12.6	FK506 bağlayan protein (RyR2 stabilizatörü)
Fors	Forskolin
HOMA	Homeostatic model assessment
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
I_{CaL}	L tipi kalsiyum kanal akımı
LTCC	L tipi kalsiyum kanalları
Mil	Milrinone
NCX	Na^{+}/Ca^{+2} değiştokuşcusu
OGTT	Oral glukoz tolerans testi
PDE	Fosfodiesteraz
PKA	Protein kinaz A
PLN	Fosfolamban
PP	Protein fosfataz
Rol	Rolipram
RyR2	Kardiyak ryanodin reseptörü
SERCA2	Kardiyak sarkoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz
SR	Sarkoplazmik retikulum
SVB	Sol ventrikül basıncı
SVDSB	Sol ventrikül diyastol sonu basıncı
TAS	Total antioksidan durumu
TOS	Total oksidan durumu
TP	Kasılmanın maksimuma ulaşma süresi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Metabolik Sendrom durumunda kalp fonksiyon bozukluğuna yol açan mekanizmalar (Ilkun ve ark., 2013).

Şekil 1.2. Ryanodin reseptör (RyR2) makromolekül kompleksi (Mohler ve ark., 2007).

Şekil 1.3. Fosfodiesteraz regülasyonu (Zaccolo ve ark., 2007).

Şekil 1.4. Fosfodiesterazların hücre içi Ca^{2+} homeostazındaki yeri. NCX; sodyum kalsiyum değiştokuşcusu, SERCA; sarkoendoplazmik retikulum Ca^{2+} ATPaz, PMCA; plazma membran Ca^{2+} taşıyıcı ATPaz, PP2A; protein fosfataz 2A, TNNC; troponin C, TNNI; troponin I (Maurice ve ark., 2014).

Şekil 1.5. Tez çalışmasının amacının şematik gösterimi

Şekil 3.1. Zamana bağlı oral glukoz tolerans testi sonuçları. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, *P<0,05 ($n_{Kontrol}$ =22, n_{MetS} =33).

Şekil 3.2. Serum insulin seviyelerinin zamana bağlı değişim grafiği. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, *P<0,05 ($n_{Kontrol}$ =10, n_{MetS} =10).

Şekil 3.3. Hemodinamik parametreler. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, *P<0,05 ($n_{Kontrol}$ =6, n_{MetS} =6).

Şekil 3.4. Serum oksidan ve antioksidan seviyelerinin spektrofotometrik olarak belirlenmesi. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, *P<0,05 ($n_{Kontrol}$ =20, n_{MetS} =20).

Şekil 3.5. Kalp dokusunun ışık mikroskop incelemesi ($n_{Kontrol}$ =9, n_{MetS} =9).

Şekil 3.6. Oil-Red O ile boyanmış doku kesitlerinde intrasitoplazmik lipid birikiminin ışık mikroskopu ile incelenmesi.

Şekil 3.7. İzovolumetrik sol ventrikül basınç değişimlerinin *in situ* olarak incelenmesi. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, *P<0,05 ($n_{Kontrol}$ =13, n_{MetS} =16).

Şekil 3.8. Elektriksel alan uyarısı ile elde edilen papiller kas kasılma-gevşeme değerleri. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, *P<0,05 ($n_{Kontrol}$ =11, n_{MetS} =14).

Şekil 3.9. L-tipi Ca^{2+} kanal akımlarının akım-voltaj karakteristiği. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, ($n_{Kontrol}$ =4, n_{MetS} =6).

Şekil 3.10. İzole kardiyomiyositlerde hücre içi Ca^{2+} transientleri. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, ($n_{Kontrol}$ =24, n_{MetS} =28).

Şekil 3.11. Metabolik sendromlu sıçan kardiyomiyositlerinde Ca^{2+} sparklarının uzaysal ve zamansal özellikleri. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, “n” hücre sayısını göstermektedir ($n_{Kontrol}$ = 71 n_{MetS} = 101).

Şekil 3.12. Kardiyomiyositlerde gruplar arası kafein yanıtlarının karşılaştırılması. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, (3-5 farklı hayvandan $n_{\text{Kontrol}}=16$, $n_{\text{MetS}}=14$).

Şekil 3.13. Sarkoplazmik retikulum Ca^{2+} -pompa (SERCA) aktivitesinin ölçülmesi. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, ($n_{\text{Kontrol}}=12$, $n_{\text{MetS}}=11$).

Şekil 3.14. Kontrol ve Metabolik sendrom (MetS) durumunda Ca^{2+} sızıntı miktarının belirlenmesi Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, ($n_{\text{Kontrol}}=8$, $n_{\text{MetS}}=11$).

Şekil 3.15. Metabolik sendromlu (MetS) sıçanlarda Ca^{2+} salınımı ile ilgili proteinlerin biyokimyasal analizi. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, ($n_{\text{Kontrol}}=6$, $n_{\text{MetS}}=6$).

Şekil 3.16. Kalp homojenatlarında farklı amino asit bölgelerinden fosforillenen fosfolamban (PLN) seviyeleri. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, ($n_{\text{Kontrol}}=6$, $n_{\text{MetS}}=6$).

Şekil 3.17. Metabolik sendromlu (MetS) sıçan kalbinde RyR2 fosforilasyonundan sorumlu PKA ve CaMKII'nin fosforilasyon düzeyleri. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, ($n_{\text{Kontrol}}=6$, $n_{\text{MetS}}=6$).

Şekil 3.18. Metabolik sendromlu (MetS) sıçan kalbinde RyR2 defosforilasyonundan sorumlu PP1A ve PP2A'nın fosforilasyon düzeyleri. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, ($n_{\text{Kontrol}}=6$, $n_{\text{MetS}}=6$).

Şekil 3.19. Metabolik sendromlu (MetS) sıçan kalp dokusunda fosfodiesteraz (PDE) protein ifade seviyeleri. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, ($n_{\text{Kontrol}}=10$, $n_{\text{MetS}}=10$).

Şekil 3.20. İzole kardiyomiyositlerde cAMP seviyelerinin ölçümü. Metabolik sendrom (MetS) grubunun kontrol grubuna göre farkının istatistiksel değerlendirilmesi * $P<0,05$ (A'da); kontrol veya MetS grubuna göre * $P<0,05$, Fors yanıtına göre $\delta P<0,05$, Rol ve Mil yanıtına göre değerlendirilmesi $\gamma P<0,05$ (B'de). MetS'da gözlenen Fors ve IBMX yanıtlarının Kontrol grubunda ölçülen değerlerine göre değerlendirilmesi * $P<0,05$ (C'de). Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, ($n_{\text{Kontrol}}=8$, $n_{\text{MetS}}=8$).

Şekil 3.21. İzometrik papiller kas kasılmaları üzerine *in vitro* PDE inhibitörlerinin etkileri. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, ($n_{\text{Kontrol}}=5$, $n_{\text{MetS}}=5$).

Şekil 3.22. Papiller kas şeritlerinde forskolin uyarısı üzerine PDE inhibitörlerinin inotropik etkileri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. * $P<0,05$ kontrol veya MetS grubuna göre (A), $\delta P<0,05$ kontrol veya MetS grubunun Fors yanıtına göre (A), $\gamma P<0,05$ ise kontrol grubunda Rol ve Mil yanıtına göre istatistiksel olarak farkları (A). * $P<0,05$ MetS grubunda gözlenen yanıtların kontrol grubunda ölçülen değerlerinden istatistiksel olarak farkı (B ve C)($n_{\text{Kontrol}}=8$, $n_{\text{MetS}}=8$).

Şekil 3.23. PDE inhibitörlerinin papiller kas kasılma zaman deseni üzerine etkileri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. * $P<0,05$ kontrol veya MetS grubuna göre, $\delta P<0,05$ Fors yanıtına göre istatistiksel olarak değerlendirilmesini, Fors deneylerinde $n_{\text{Kontrol}}=24$, $n_{\text{MetS}}=22$, PDE inhibitörlerinin uygulandığı deneylerde $n_{\text{Kontrol}}=8$, $n_{\text{MetS}}=8$.

Şekil 3.24. PDE inhibitörlerinin Ca^{2+} transienleri üzerine etkileri. Çubuk-grafiklerdeki değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir.* $P<0,05$ kontrol grubuna ve $\delta P<0,05$ MetS grubuna göre farkların istatistiksel olarak değerlendirilmesini göstermektedir ($n_{\text{Kontrol}}=10$, $n_{\text{MetS}}=10$).

Şekil 3.25. Ca^{2+} transienleri üzerindeki forskolin yanıtlarına *in vitro* PDE inhibitörlerinin etkileri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. * $P<0,05$ kontrol veya MetS grubuna göre, $^{\delta}P<0,05$ kontrol veya MetS grubunun Fors yanıtına göre, $^{\gamma}P<0,05$ ise MetS grubunda Rol ve Mil yanıtına göre istatistiksel olarak farkı (A'da). * $P<0,05$ MetS grubunda gözlenen yanıtların kontrol grubunda ölçülen değerlerinden istatistiksel olarak farkını göstermektedir (C'de). Fors uygulamasının yapıldığı deneylerde $n_{\text{Kontrol}}=48$, $n_{\text{MetS}}=58$, PDE inhibitörlerinin uygulandığı deneylerde Rol, Mil, IBMX uygulaması için sırasıyla $n_{\text{Kontrol}}=24$, $n_{\text{MetS}}=24$, $n_{\text{Kontrol}}=15$, $n_{\text{MetS}}=20$, $n_{\text{Kontrol}}=17$, $n_{\text{MetS}}=18$.

Şekil 3.26. Ca^{2+} salınma sayısı üzerine PDE inhibitörlerinin etkileri. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, * $P<0,05$ MetS grubunda gözlenen inhibitör etkilerinin, kontrol grubunda ölçülen değerlerinden istatistiksel olarak farkını göstermektedir. Rol, Mil, IBMX uygulaması için sırasıyla $n_{\text{Kontrol}}=24$, $n_{\text{MetS}}=24$, $n_{\text{Kontrol}}=15$, $n_{\text{MetS}}=20$, $n_{\text{Kontrol}}=17$, $n_{\text{MetS}}=18$.

Şekil 3.27. PDE inhibitör uygulamasının Ca^{2+} transient zaman parametreleri üzerine etkilerinin incelenmesi. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. * $P<0,05$ kontrol veya MetS grubuna göre, $^{\delta}P<0,05$ kontrol veya MetS grubunda ölçülen Fors yanıtına göre istatistiksel olarak farkı göstermektedir. Fors uygulamasının yapıldığı deneylerde $n_{\text{Kontrol}}=48$, $n_{\text{MetS}}=58$, PDE inhibitörlerinin uygulandığı deneylerde Rol, Mil, IBMX uygulaması için sırasıyla $n_{\text{Kontrol}}=24$, $n_{\text{MetS}}=24$, $n_{\text{Kontrol}}=15$, $n_{\text{MetS}}=20$, $n_{\text{Kontrol}}=17$, $n_{\text{MetS}}=18$.

Şekil 3.28. PDE inhibitörlerinin protein fosforilasyonları üzerine etkileri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. Kontrol veya MetS grubuna göre * $P<0,05$, kontrol veya MetS grubunda ölçülen Fors yanıtına göre $^{\delta}P<0,05$ (A ve B'de), MetS grubunda gözlenen yanıtların kontrol grubunda ölçülen değerlerinden istatistiksel olarak farkını * $P<0,05$ (D'de) göstermektedir ($n_{\text{Kontrol}}=4$, $n_{\text{MetS}}=4$).

Şekil 3.29. PDE inhibitörlerinin protein fosforilasyonları üzerine etkileri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. Kontrol veya MetS grubuna göre * $P<0,05$, kontrol veya MetS grubunda Fors yanıtına göre $^{\delta}P<0,05$, kontrol veya MetS grubunda Rol ve Mil yanıtına göre istatistiksel olarak farkı $^{\gamma}P<0,05$ göstermektedir (A ve B'de). MetS grubunda gözlenen yanıtların kontrol grubunda ölçülen değerlerinden istatistiksel olarak farkını * $P<0,05$ göstermektedir (C'de) ($n_{\text{Kontrol}}=4$, $n_{\text{MetS}}=4$).

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Metabolik sendrom tanı kriterleri

Çizelge 1.2. Yüksek-sükroz diyetinin kardiyak etkileri

“↑” yüksek sükroz-etkisi ile oluşan artış, “↓”azalış ve “↔” yüksek sükroz uygulamasının istatistiksel bir fark oluşturmadığı durumları ifade etmektedir. Referanslar; 1, Banos ve ark. 2005; 2, Cardenas ve ark. 2006; 3, deA. Freitas ve ark. 2008; 4,Pang ve ark. 2008; 5, Santure ve ark. 2002; 6,Hintz ve ark. 2003;7, Vasanji ve ark. 2006; 8,Fang ve ark. 2005; 9, Dong ve ark. 2006; 10, Gonsolin ve ark. 2007; 11,Diniz ve ark. 2008; 12, Davidoff ve ark. 2004; 13, Wold ve ark. 2005; 14, Dutta ve ark. 2001.

Çizelge 3.1. Deney hayvanlarının genel parametreleri

Ölçüm değerleri ortalama±SEM olarak gösterilmiştir. Kontrole göre *P<0,05, (¹ n_{Kontrol} =30, n_{MetS}=44 ; ²n_{Kontrol} =10, n_{MetS}=10; ³ n_{Kontrol} =9, n_{MetS}=8; ⁴ n_{Kontrol} =5, n_{MetS}=6; ⁵ n_{Kontrol} =22, n_{MetS}=33).

1. GİRİŞ

1.1. Metabolik Sendrom

Vücuda alınan enerjinin harcanan enerjiye oranının artması metabolik sendromun oluşmasına yol açan en genel etkidir. Metabolik sendrom (MetS), obezite, hiperinsülinemi, hiperlipidemi, hipertansiyon ile karakterize olan ve kardiyovasküler hastalıklar ile tip 2 diyabet için ciddi risk faktörü oluşturan bir patolojidir (Hanson ve ark., 2002). Fiziksel aktivite eksikliği, dengesiz ve aşırı beslenme insülin direncine yol açarak MetS oluşumuna zemin hazırlar (Meigs ve ark., 2002). İlk kez 1988’de Reaven tarafından tanımlanmış olan MetS, “insülin direnci sendromu” olarak da adlandırılır (Reaven, 1988). 1988’de hastalığın tanımlanmasından sonra çeşitli tanı kriterleri oluşturularak hastalığın klinik teşhisinin doğru ve pratik bir şekilde yapılabilmesi için çeşitli organizasyonlarda çalışma grupları oluşturulmuştur. Grundy ve ark. tarafından 2004 yılında yayınlanan raporda, Amerikan Ulusal Kolesterol Eğitim Programı Üçüncü Erişkin Tedavi Panel (Adult Treatment panel III: ATP III) kılavuzunda belirtilen kriterler ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından tanımlanan kriterler birarada değerlendirilerek, günümüzde kabul gören MetS tanı kriterleri belirtilmiştir (Çizelge 1.1) (Grundy, 2004).

Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği’nin MetS çalışma grubu tarafından 2009 yılında yayınlanan çalışma raporunda MetS, insülin direnci ile başlayan abdominal obezite, glukoz intoleransı, dislipidemi, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı gibi sistemik bozuklukların birbirine eklendiği ölümcül bir endokrinopati olarak tanımlanmıştır. Türkiye popülasyonunda gözlenen MetS prevalansı erkeklerde % 24-32, kadınlarda % 39-45 oranındadır (Demiral ve ark., 2006; Gundogan ve ark., 2009; Onat, 2002; Onat ve ark., 2013; Soysal ve ark., 2005). Onat ve ark. 2013 yılında Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi’nde yayınladıkları çalışmada, Türk popülasyonunda (40 yaş ve üzeri) MetS prevalansının % 53 düzeyinde olduğunu ve

Türkiye'nin güneydoğusunda bu değerin en yüksek, Ege bölgesinde ise en düşük olduğunu rapor etmişlerdir (Onat ve ark., 2013).

Çizelge 1.1. Metabolik sendrom tanı kriterleri

	WHO	ATP III
Hipertansiyon	Kan basıncı > 140/90 mmHg	Kan basıncı >130/85 mmHg
Dislipidemi	Trigliserit > 150 mg/dL HDL < 35-40 mg/dL	Trigliserit > 150 mg/dL HDL < 40-50 mg/dL
Obezite	Beden kütle indeksi > 30 Bel/Kalça oranı > 0,9-0,85	Bel çevresi > 102-88 cm
Glukoz	Tip 2 diyabet veya bozulmuş glukoz toleransı	Açlık kan şekeri > 110 mg/dL
Diğer	Üriner albumin atım hızı $\geq 20 \mu\text{g/dk}$	
Tanı için	İnsulin direncine ek olarak yukarıdaki kriterlerden en az iki tanesine sahip olmak	Yukarıdaki kriterlerden en az üç tanesine sahip olmak

1.2. Yüksek-Sükroz Diyeti ile Metabolik Sendrom Deney Modelinin Oluşturulması

Hastalıkların gelişim nedenlerini ve patofizyolojisini incelemek amacıyla hayvan modelleri kullanımı oldukça yaygın ve kullanışlıdır. Bir hastalığın hayvan modeli, o hastalığın patofizyolojik karakteristiklerinin çoğunu temsil ettiği durumda iyi bir model olarak kabul edilir. Metabolik sendrom (MetS) deney modelleri erişim, üreme ve kullanım kolaylıklarının yanısıra gen haritalarının iyi bilinmesi nedeniyle fare ve sıçanlarda uygulanmaktadır (Caroline ve ark., 1998). Deney hayvanlarında MetS genellikle genetik manipülasyon ya da diyet-indüklü olarak oluşturulmaktadır. Yaygın olarak kullanılsa da düşük doz streptozotosin (20-35 mg/kg) uygulamasının ardından diyet-indüklü model ile MetS'in oluşturulduğu çalışmalara da rastlanmaktadır (Li ve ark., 2015).

Genetik MetS Deney Modelleri;

- **ob/ob Fare;** 6. kromozondaki leptin geninde otozomal resesif mutasyon taşırlar. Leptin genindeki mutasyondan 4-hafta sonra obezite, hiperinsulinemi

ve hiperglisemi oluşurken 12. haftanın sonunda fareler glukoz toleransı kazanır (Panchal ve ark., 2011; Polotsky, 2007).

- **db/db Fare;** 4. kromozom üzerindeki leptin reseptör geninde mutasyon vardır. Mutasyon nedeni ile leptin reseptörü işlevsel değildir ve leptin hormonuna yanıt oluşturamaz. Bu hayvanlarda insulin direnci, hiperglisemi oluşmadan gözlenir (Panchal ve ark., 2011; Sharma ve ark., 2003).
- **ZDF (Zucker Diabetic Fatty) Sıçan;** Leptin reseptör geninde mutasyon taşırlar. Açlık kan glukoz düzeyleri yüksektir. İnsulin düzeyleri ise normalden 10-20 kat daha yüksektir. Hipertrigliseridemi, sistolik ve diyastolik fonksiyon bozukluğu görülür (Panchal ve ark., 2011; Shafrir ve ark., 2009).
- **OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) Sıçan;** Bu sıçanlarda pankreatik asini hücreleri kolesistokin-1 reseptöründen yoksun oldukları için besin alımını düzenleyen kolesistokin hormonuna duyarsızdırlar. Besin alımı fazla olan bu hayvanlarda 18.haftanın sonunda açlık kan glukoz düzeyinin yükselmesine karşın glukoz toleransı ancak 24.haftanın sonunda oluşmaktadır (Kawano ve ark., 1994).
- **Goto-Kakizaki Sıçan;** Bu sıçanlar obez değildir ve doğuştan pankreatik beta hücreleri hasarlı doğarlar. 4-haftalık iken bozulmuş glukoz toleransına sahiptirler (Portha ve ark., 2010).

Diyet-indüklü MetS Deney Modelleri;

- **Yüksek Yağlı Diyet ile İndüklenen;** Genel olarak toplam enerjinin % 30'undan fazlasında yağ içeren diyetler obezite gelişimine neden olur. Yüksek yağlı diyet ile oluşturulan MetS hayvan modellerinde insulin direnci, dislipidemi ve obezite görülmektedir (Silva ve ark., 2006).
- **Yüksek Fruktöz İçeren Diyet ile İndüklenen;** Diyetteki fruktozun ana kaynağı; sükröz, yüksek fruktozlu mısır şurubu (HFCS), meyveler ve baldır. Diyet ile alınan fruktoz, fosfofruktokinaz enzimi aracılığıyla karaciğer lipid metabolizmasına direk etki etmektedir. Artmış fruktoz tüketimi hormonal değişimler ve inflamasyon oluşumuna ek olarak plazma ürik asit düzeyini etkilemesi nedeniyle MetS deney modeli olarak kullanılabilir (Basciano ve ark., 2005).

- **Yüksek Sükroz İçeren Diyet ile İndüklenen;** Fruktozun diyet kaynağı olan sükroz ile besleme, deney hayvanlarında insanda oluşan MetS'a en yakın patolojilerin gözleendiği MetS deney modelidir. Sükroz, bozulmuş glukoz toleransı ile beraber plazmada artmış insulin, leptin, trigliserit, glukoz ve yağ asitleri ile MetS oluşumuna yol açar (Panchal ve ark., 2011).
- **Yüksek Karbonhidrat-Yüksek Yağ İçeren Diyet ile İndüklenen;** Bu diyetle kullanılan temel karbonhidratlar sükroz ve fruktoz iken, yağlar değişkenlik gösterir. Sükroz içeriği % 10-30, yağ içeriği ise % 20-40 arasında kullanılmaktadır. Bu diyet ile beslenen kemirgenlerde vücut ağırlık artışı, abdominal yağlanma, hiperinsulinemi, hiperglisemi ve hiperleptinemi varlığı gösterilmiştir (Panchal ve ark., 2011). Bu model insan diyetine en yakın diyet modellerden biri olarak gösterilse de gözlenen patolojilerin mekanistik açıklamalarının yapılması hedeflenen araştırmalar için diyet heterojenitesi dezavantaj oluşturmaktadır.

MetS oluşumu için yüksek sükroz içeren diyet ile indüklenen deney modeli, bu hastalığın etiyolojisine en çok uyan modeldir. Yüksek sükroz içeren diyetin tarihsel gelişimine baktığımızda 18.yy'da Avrupa'da gerçekleşen sanayi devrimi ile birlikte insanların daha çok basit şeker içeren, karbonhidrat kaynağı besinleri tüketmeye başladıkları görülmektedir. 1970'lerin sonlarında teknolojinin ilerlemesi ile kromatografik fruktoz zenginleştirilmesi gerçekleşmiş ve daha ekonomik olan yüksek fruktoz içerikli mısır şurubu (HFCS) üretilmiştir. Rafine fruktozun total tüketim miktarı 1970'de yılda 0,3 kg iken, 2000 yılında 14,7 kg'a çıkmıştır. Diyet ile alınan toplam fruktozun toplam miktarı 1970'de 23,4 kg iken 2000 yılında 29,5 kg'a çıkmış ve 1909'dan 1999 yılına kadar Amerika'daki şeker tüketimi % 64 artmıştır (Nielsen ve ark., 2002). Şu anda tipik Amerikan diyetinde, yüksek glisemik indeksli şekerler (HFCS 42, HFCS 55, sükroz, glikoz, bal, şuruplar), alınan toplam enerjinin % 16,2'sini ve yüksek glisemik indeksli rafine tahıl ürünleri ise enerjinin % 20'sini oluşturmaktadır (Nielsen ve ark., 2002). Bu tarz diyetin, insülin direncine, hiperglisemi ve hipertrigliseridemiye neden olduğu bilinmektedir. Sükroz ile tatlandırılmış içeceklerin (STİ) yaygın ve dramatik etki nedenlerinin açıklanabilmesi için çalışmalar yapılmış ve sonuç olarak; bu içeceklerin fazla miktarda tüketiminin

beyinde tokluk hissinin daha az algılanmasına ve midede katı gıdalara kıyasla daha az doluluk hissi yarattığı için kalori alımının artmasına yol açtığı rapor edilmiştir (Schulze ve ark., 2004). İzokalorik sıvı ve katı besinlerin kilo alımı üzerine etkilerini değerlendiren bir başka çalışmada ise, 450 kcal/gün içerikli STİ tüketen kişilerin, aynı kalori miktarına sahip jelibon tüketen kişilere göre daha fazla katı besin tükettiği ve kilo aldığı görülmüştür (DiMeglio ve ark., 2000). Ayrıca STİ tüketiminin kilo artışına neden olması davranışsal mekanizmalar yolu ile de açıklanmaya çalışılmıştır. Şöyle ki; katı besinlerin tüketimi genellikle açlık ile uyarılırken, açlık hissetmeden de susuzluk ya da sosyal nedenlerle kalorili içeceklerin tüketilebildiği öne sürülmüştür (Brownell ve ark., 2009). 8-yıl boyunca izlenen kadın katılımcılardan elde edilen verilere göre günde bir adet STİ tüketenlerde ayda bir adet tüketenlere göre Tip-2 diyabet (T2DM) gelişme riski % 83 daha fazla bulunmuştur (Schulze ve ark., 2004). 300,000 kişi katılımlı gerçekleştirilen başka bir çalışma sonucuna göre ise, günde 1-2 adet STİ tüketen kişiler ayda 1 adet STİ tüketen kişilere göre % 20 daha fazla MetS olma riski taşımaktadır (Malik ve ark., 2010). 6,000 kişi katılımlı “Framingham Offspring Study” çalışması günlük STİ tüketen bireylerde tüketmeyenlere göre hipertrigliseridemi ve düşük HDL kolesterol görülme sıklığının % 22 daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Dhingra ve ark., 2007).

Yüksek sükroz içeren diyet ile besleme prosedürünün kardiyak etkileri Çizelge 1.2’de özetlenmiştir. 4-6, 8-10, 12-14 numaralı kaynaklarda kullanılan yüksek sükroz içeren diyetle sükroz içeriği % 61-77 iken 1-3, 7, 11 numaralı kaynaklarda kullanılan diyet içerikleri % 30-32 sükroz içeren içme suyundan oluşmaktadır. 3-4 haftalık yüksek sükroz alımının deney hayvanlarında plazma glukoz düzeylerini etkilemezken hiperinsulinemiye neden olduğu gösterilmiştir (Davidoff, Mason, ve ark., 2004; de Freitas ve ark., 2008; Fang ve ark., 2005; Gonsolin ve ark., 2007; Pang ve ark., 2008). Sükroz ile beslenen sıçanlarda artmış plazma trigliserit ve LDL kolesterol düzeyleri bu deney modelinde sistemik lipid regülasyonunun bozulduğunu göstermektedir (Banos ve ark., 2005; Cardenas ve ark., 2006; Davidoff, Boyden, ve ark., 2004). Yüksek sükroz içerikli diyet ile besleme protokolü 6-haftayı geçtiği takdirde deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının değişmediği durumda glukoz intoleransının ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Dutta ve ark., 2001; Reiser ve ark.,

1981; Schwanke ve ark., 2006; Sumiyoshi ve ark., 2006). Kaynaklarda yalnızca bir çalışmada yüksek şükroz içerikli diyet ile beslenen sıçanlarda hipertansiyon gelişmediği (Santure ve ark., 2002) gösterilirken diğer çalışmalarda dişi ve erkek sıçanlarda bu diyetin hipertansiyona neden olduğu rapor edilmiştir (de Freitas ve ark., 2008; Pang ve ark., 2008; Perez-Torres ve ark., 2008; Perricone ve ark., 2008).

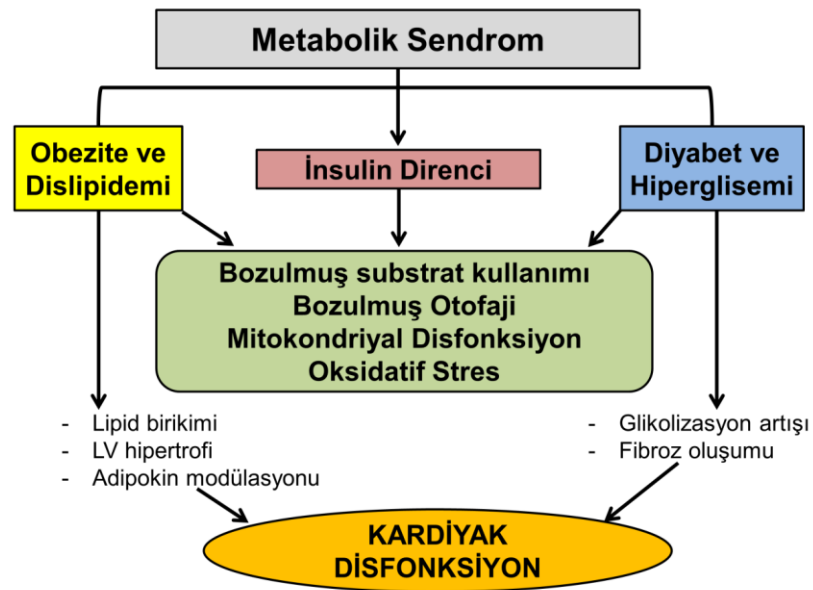
Çizelge 1.2. Yüksek-şükroz diyetinin kardiyak etkileri

Parametre	Organizma	Etki	Kaynak
Kan Basıncı	Sıçan Sıçan	↑ ↔	1,2,3,4 5
Kalp Ağırlığı	Sıçan, Fare	↔	2,6,7,8,9,10,11
Kardiyomiyosit Büyüklüğü	Fare Sıçan	↑ ↔	8 6
Kalp Atım Hızı	Sıçan Sıçan Sıçan	↑ ↓ ↔	7 10 5
Kan Pompalama Miktarı	Sıçan	↑	7
Kalp Kısalma Oranı	Fare	↓	7
Mekanik İş	Sıçan	↓	2
Kalp O ₂ Tüketimi	Sıçan	↓	10
Kardiyomiyosit Kısalma Süresi	Sıçan Sıçan	↑ ↓	12,13 6
Kardiyomiyosit Gevşeme Süresi	Sıçan	↑	6,8,9,12,13
Kardiyomiyosit Ca ²⁺ Transient Sönümlenme Süresi	Sıçan, Fare	↑	6,9,13,14
SR Ca ²⁺ Alımı	Sıçan	↓	7,13
SERCA2 Protein	Sıçan	↔	7,9,13
Fosforile-Fosfolamban Proteini	Sıçan Sıçan	↔ ↓	9,13 7
NCX Proteini	Sıçan Sıçan	↔ ↓	13 9
Kalp Anjiyotensin II	Sıçan	↑	4
Kalp Antioksidanları	Sıçan	↓	11

“↑” yüksek şükroz-etkisi ile oluşan artış, “↓”azalış ve “↔” yüksek şükroz uygulamasının istatistiksel bir fark oluşturmadığı durumları ifade etmektedir. Referanslar; 1, Banos ve ark. 2005; 2, Cardenas ve ark. 2006; 3, deA. Freitas ve ark. 2008; 4,Pang ve ark. 2008; 5, Santure ve ark. 2002; 6,Hintz ve ark. 2003;7, Vasanji ve ark. 2006; 8,Fang ve ark. 2005; 9, Dong ve ark. 2006; 10, Gonsolin ve ark. 2007; 11, Diniz ve ark. 2008; 12, Davidoff ve ark. 2004; 13, Wold ve ark. 2005; 14, Dutta ve ark. 2001.

1.3. Metabolik Sendrom ile Oluşan Kardiyak Fonksiyon Bozukluğunda Rol Alan Moleküler Mekanizmalar

Metabolik sendrom obezite, insulin direnci, hipertansiyon ve dislipidemi ile karakterize kompleks bir metabolik patolojidir (Eckel ve ark., 2005; Gaddam ve ark., 2011). Bu sendromun komponentlerinin kardiyovasküler hastalıklar, kalp yetmezliği ve mortaliteyle ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Ingelsson ve ark., 2010; Malik ve ark., 2004; Malik ve ark., 2010). MetS durumunda gözlenen dislipidemi, insulin direnci ve hiperglisemi kardiyomiyosit metabolizmasında bozukluğa yol açarak kardiyak fonksiyon bozukluğu ya da kalp yetmezliği gelişimine neden olur (Şekil 1.1). Bu değişimlere paralel olarak ortaya çıkan, vasküler fonksiyon bozukluğu, koroner arter hastalığı ve hipertansiyon da MetS olgusunda kardiyak fonksiyon bozukluğunun ortaya çıkmasına katkıda bulunur (Hanson ve ark., 2002). Metabolik sendroma sahip olan kişilerin tip-2 diyabete (T2DM) ve kardiyovasküler hastalıklara yakalanma riski sahip olmayanlara göre sırasıyla 5- ve 3-kat daha fazladır (Grundy, 2004). 34-59 yaşlarındaki kadınların 20-yıl boyunca izlendiği bir çalışmada, koroner kalp hastalığı, felç ya da diyabet öyküsü olmayan katılımcıların düzenli STİ tüketiminin koroner kalp hastalığı riskini arttırdığı gösterilmiştir (Fung ve ark., 2009).



Şekil 1.1. Metabolik sendrom durumunda kalp fonksiyon bozukluğuna yol açan mekanizmalar (Ilkun ve ark., 2013).

MetS durumunda gözlenen kardiyak fonksiyon bozukluğunun altında yatan nedenleri açıklamak üzere çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Örneğin, klinikte miyokardiyal trigliserit (TG) içeriği, konsentrik sol ventrikül hipertrofisi ve sistolik fonksiyon bozukluğu arasında korelasyon rapor edilmiştir (Szczepaniak ve ark., 2003). Benzer şekilde obezite ya da T2DM hastalarının kalplerinde yüksek TG gözlenmesi, kardiyak lipid birikiminin MetS durumunda gözlenen kalp fonksiyon bozukluğu patogeneze katkı sağladığını düşündürmektedir (Sharma ve ark., 2003). MetS'lu hastaların kalp fonksiyonlarının incelendiği çalışmalarda sağ (Tadic ve ark., 2014) ve sol ventrikül (Crendal ve ark., 2014) kasılma mekanizmasının ve senkronizasyonunun bozulduğu gösterilmiştir.

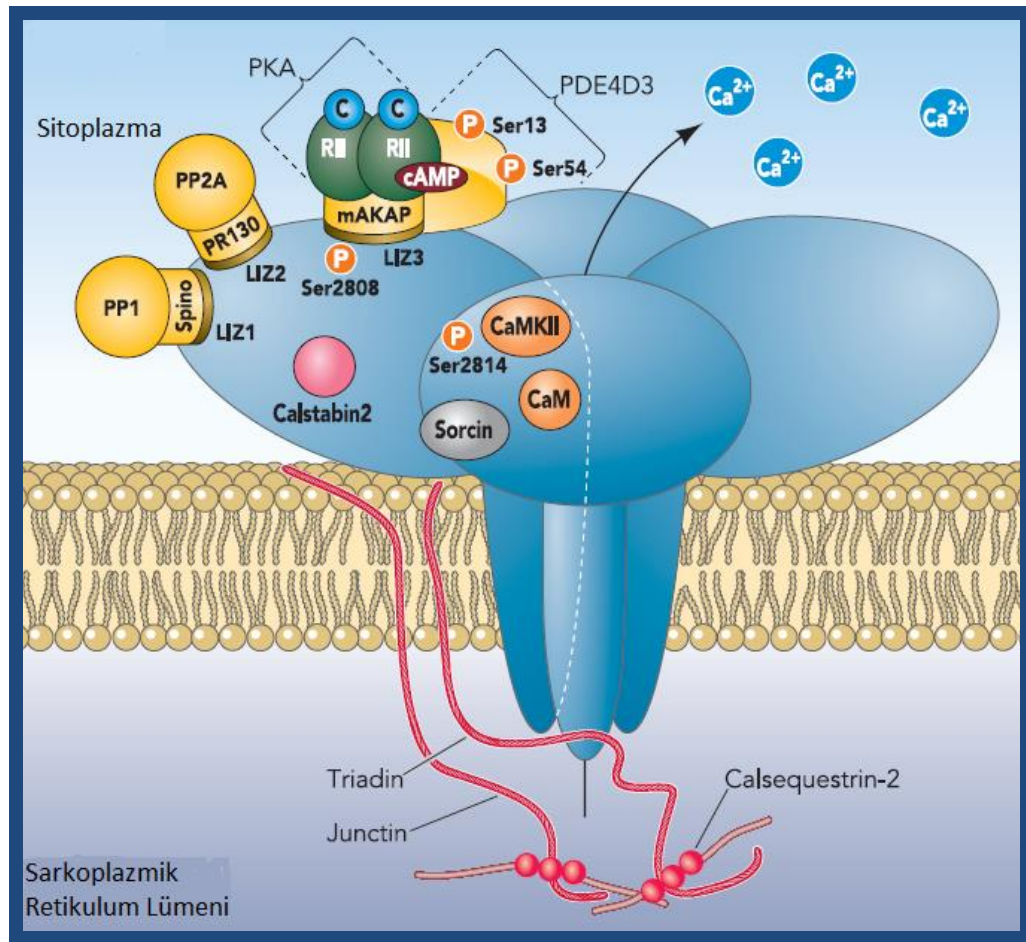
Klinikte gözlenen kardiyak fonksiyon bozukluklarının altında yatan mekanizmalar MetS hayvan deneyi modelleri ya da in-vitro çalışmalar ile araştırılmaktadır. MetS durumunda gözlenen insulin direncinin sistemik anomalilerden bağımsız olarak kalp fonksiyon bozukluğuna yol açtığı, fare kardiyomiyositlerindeki insulin reseptörlerinin spesifik olarak silindiği mutant farelerde (CIRKO fare) gösterilmiştir (Belke ve ark., 2002). Bu farelerde kalp performansında bir değişim gözlenmezken, basınç artışı (Hu ve ark., 2003), isoproterenol (McQueen ve ark., 2005) ya da miyokardiyal infarktüs (Sena ve ark., 2009) gibi stres durumlarına verdikleri cevapların kontrol durumuna göre istatistiksel olarak anlamlı değişim gösterdiği bulunmuştur. Bu veriler doğrultusunda insulin direncinin obezite ya da diyabet gibi sistemik hastalıkların olmadığı durumda dahi kalp disfonksiyonuna yol açtığı varsısına ulaşılmıştır.

Yüksek sükröz içerikli diyet ile MetS deney modeli oluşturulan sıçanlarda ventriküler miyositlerin kısalma ve tekrar uzama evrelerinin kontrole göre (% 42-63) daha yavaş olduğu görülmüştür (Davidoff, Mason, ve ark., 2004). Mellor ve ark. 2012 yılında yayınladıkları çalışmada 12 hafta boyunca yüksek fruktoz içeren diyet ile beslenen sıçan kardiyomiyositlerinde Ca^{2+} transient şiddetinin kontrole göre % 42 düşük olduğunu, transientin sönümlenme fazı zaman sabitinin ise % 24 oranında uzadığını göstermişlerdir (Mellor ve ark., 2012). Kalp yetmezliği durumunda bozulmuş hücre içi Ca^{2+} homeostazının kalp performansını etkilediği bilinmektedir.

Kalp yetmezliği deney modellerinde azalmış sarko-endoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz (SERCA) ve kardiyak ryanodin reseptör (RyR2) fonksiyonları ve SERCA ve fosfolamban seviyelerinde değişimler rapor edilmiştir (Arai ve ark., 1994; Bers, 2000; Choi ve ark., 2002; Grassi ve ark., 2007; Hattori ve ark., 2000; Kim ve ark., 2001; Li ve ark., 2005; Neticadan ve ark., 2001; Pieske ve ark., 1999; Pogwizd ve ark., 1999; Takizawa ve ark., 1999; Yao ve ark., 2009). Bu nedenle MetS-indüklü oluşan kalp fonksiyon bozukluğunun mekanistik ačíklamasının yapılabilmesi için RyR2 ve SERCA'nın aktiviteleri ve modulasyonları bir çok çalışmada incelenmiştir.

Ryanodin reseptörü homotetramerik yapısı ile bugüne kadar bilinen en büyük iyon kanalıdır (şekil 1.2). Reseptörün tek bir monomeri yaklaşık 5000 aminoasitten oluşmaktadır ve toplam molekül ağırlığı 2,2 MDa'dur (Inui ve ark., 1987; Lai ve ark., 1988). Ryanodin reseptörünün kardiyak formu (RyR2) kardiyak kasılma-gevşeme iftleniminde önemli bir role sahiptir (Nakai ve ark., 1990; Otsu ve ark., 1990). Kardiyomiyositlerde plazma membran depolarizasyonu voltaj kapılı L-tipi Ca^{2+} kanallarının açılması ile ekstraselüler sıvıdan hücre içine Ca^{2+} girişine neden olur. RyR2'lerindeki Ca^{2+} sensörleri Ca^{2+} 'u bağlayarak kanalın açılmasını sağlar ve sarkoplazmik retikulumdan (SR) Ca^{2+} salınımı meydana gelir. Bu durum Ca^{2+} indüklü Ca^{2+} salınımı olarak bilinir (Endo ve ark., 1970; Fabiato, 1983). RyR2 fonksiyonları çeşitli aksesuar proteinler ve enzimler tarafından düzenlenmektedir. FK506 bağlayan protein (FKBP12.6) RyR2'lerine bağlanarak reseptörün fonksiyonunu modüle eden aksesuar bir proteindir (Chelu ve ark., 2004). RyR2 fonksiyonu bazı kinazlar [Protein kinaz A(PKA), Protein kinaz G, Ca-CaM bağımlı kinaz (CaMKII)], fosfatazlar (Protein fosfataz1 (PP1), PP2) ve fosfodiesterazlar (PDE4D3) tarafından modüle edilmektedir (Rababa'h ve ark., 2013). Bu modülatörler RyR2'lerine bir platform proteini aracılığıyla bağlı bulunmakta ve bu sayede etkilerini bölgesel düzeyde gösterebilmektedirler (Ruehr ve ark., 2003). PKA, artmış adrenerjik uyarım durumunda fizyolojik stres sinyalinin RyR2'lerine ulaştırması açısından önemli ve çok çalışılmış bir kinazdır. Yapılan çalışmalarda kalp yetmezliği durumunda, RyR2'lerinin PKA aracılığıyla 2808. serine aminoasitinden hiperfosforile olduğu ve RyR2 kompleksinden FKBP12.6 proteinin ayrıldığı gösterilmiştir (Wehrens ve ark., 2006; Xiao ve ark., 2004). FKBP12.6, RyR2'lerinin

kapalı durumlarının stabilizasyonunu sağlayan bir protein olduğu için bu proteinin kaybı ile RyR2'lerinin aktivitelerinin arttığı ve Ca^{2+} salma senkronizasyonunun bozulduğu gösterilmiştir (Marx ve ark., 2000). Ayrıca hücrede artan oksidatif stresin, RyR2'lerinin FKBP12.6 proteinine olan afinitelerini etkileyerek veya oksidasyonuna neden olarak reseptör fonksiyonunu etkilediği bilinmektedir (Andersson ve ark., 2011). RyR2'leri PKA'nın yanı sıra CaMKII-aracılığıyla da RyR2'lerini 2808. serine aminoasitinden fosforillenmektedir. CaMKII-aracılı RyR2 fosforilasyonunun kanalın Ca^{2+} duyarlılığını ve açılma olasılığını arttırarak kardiyak aritmi ve kontraktıl fonksiyon bozukluklarına yol açtığı gösterilmiştir (Ai ve ark., 2005; Wehrens ve ark., 2004).



Şekil 1.2. Ryanodin reseptör (RyR2) makromolekül kompleksi (Mohler ve ark., 2007).

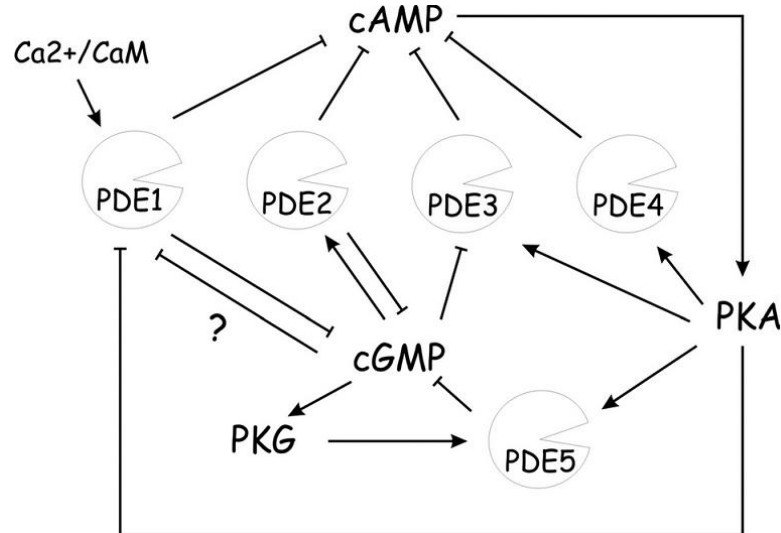
Dincer ve ark. 2006 yılında yayınladıkları çalışmada metabolik sendromlu köpeklerin sağ ve sol ventrikül hücrelerinde RyR2 fosforilasyonunun arttığını ve bu

artışın reseptörün ryanodin bağlama afinitesindeki azalma ve kalp performansındaki düşüş ile korele olduğunu göstermişlerdir (Dincer, Araiza, Knudson, Shao, ve ark., 2006). Söz konusu deney hayvanlarında dolaşımda artan epinefrin ve norepinefrin düzeyleri dikkate alınarak, MetS deney modelinde beta adrenerjik uyarım-indüklü PKA aktivasyonu aracılığıyla RyR2'lerinin hiperfosforile olduğu yorumlanmıştır (Dincer, Araiza, Knudson, Molina, ve ark., 2006).

Miklos ve ark. 2012 yılında yayınladıkları çalışmada, 6 hafta boyunca fruktozdan zengin diyet ile beslenen sıçanlarda kardiyak hipertrofi gelişmesine rağmen in-vivo ya da ex-vivo ölçülen kardiyak hemodinamik performansın değişmediğini göstermişlerdir (Miklos ve ark., 2012). Bu sıçanlarda Ca^{2+} transienlerinin sönümlenme süreleri ve hızları değerlendirildiğinde Ca^{2+} 'un eliminasyon kapasitesinde azalma olduğu bulunmuştur. Fruktoz beslemesi SERCA ve fosforillenmiş fosfolamban (pPLN) protein seviyesinde artışa neden olurken toplam PLN protein seviyesini etkilememiştir (Miklos ve ark., 2012). Kaynaklarda MetS deney modellerinde ölçülen SERCA ve pPLN protein miktarları hakkında çelişkili sonuçlar vardır. Mellor ve ark. yayınladıkları çalışmaya göre ise 12-hafta fruktoz ile beslenen sıçanlarda SERCA ve pPLN protein miktarlarında azalma gözlenirken PP2A'nın protein seviyesinin ise arttığı gösterilmiştir (Mellor ve ark., 2012). Araştırmacılar artmış PP2A aktivitesinin pPLN düzeylerini azaltması sonucunda SERCA aktivitesinin düşük bulunduğu sonucuna ulaşmışlardır. Çünkü PLN bazal durumda SERCA aktivitesini engelleyen bir proteindir ancak fosforillendiği durumda SERCA üzerindeki inhibisyonu kalkar (Mellor ve ark., 2012). SERCA aktivitesi ve protein seviyesinin diyabet ve MetS durumunda azaldığı deney modellerinde, hemodinamik fonksiyon bozukluğunun SERCA gen transferi ile düzelebildiği gösterilmiştir (Connelly ve ark., 2007; Miklos ve ark., 2012). T2DM'li sıçanlarda SERCA gen transferi ile sol ventrikül gevşeme yanıtında gözlenen uzamanın düzelmesine ek olarak kasılmanın gerçekleşmesi için gerekli olan oksijen miktarının da azalması metabolik regülasyonda Ca^{2+} 'un önemini göstermektedir (Sakata ve ark., 2007).

1.5. Fosfodiesterazların Kalpteki İfade Düzeyleri ve Modülasyonu

Hücre içinde cAMP artışına neden olan iki temel mekanizma vardır. Bunlardan ilki adenilil siklaz (membrana bağlı olarak bulunan ve ATP'nin cAMP'ye dönüşümünü katalizleyen enzim) aktivasyonu aracılığıyla cAMP sentezinin artması, ikincisi ise cAMP degradasyonunun fosfodiesteraz (PDE) inhibisyonu ile yavaşlamasıdır. PDE'ların C-terminal bölgeleri katalitik, N-terminal bölgeleri ise regülatör bölgedir. N-terminal bölge regülatör proteinler için bağlanma noktaları içerir ve çeşitli kinazlar tarafından bu bölgedeki aminoasitler fosforillenerek enzimin aktivitesi regüle edilir (Beavo, 1995; Conti ve ark., 1995; Manganiello, Murata, ve ark., 1995). PDE aktivitesi kardiyomiyositlerin sitoplazma, mikrozom ve nükleus ekstraktlarında gözlenmiştir (Ahluwalia ve ark., 1984). Kardiyomiyositlerde dört PDE ailesi tanımlanmıştır. PDE1; Ca/CaM ile aktive olan ve hem cAMP hem de cGMP'yi hidrolize eden, PDE2; cGMP ile aktive olan ve hem cAMP hem de cGMP'yi hidrolize eden, PDE3; cGMP ile inhibe olduğu bilinen ve hem cAMP hem de cGMP'yi hidrolize eden ve PDE4; özellikle cAMP'yi hidrolize ettiği bilinen bir fosfodiesteraz ailesidir (Maurice ve ark., 2003).



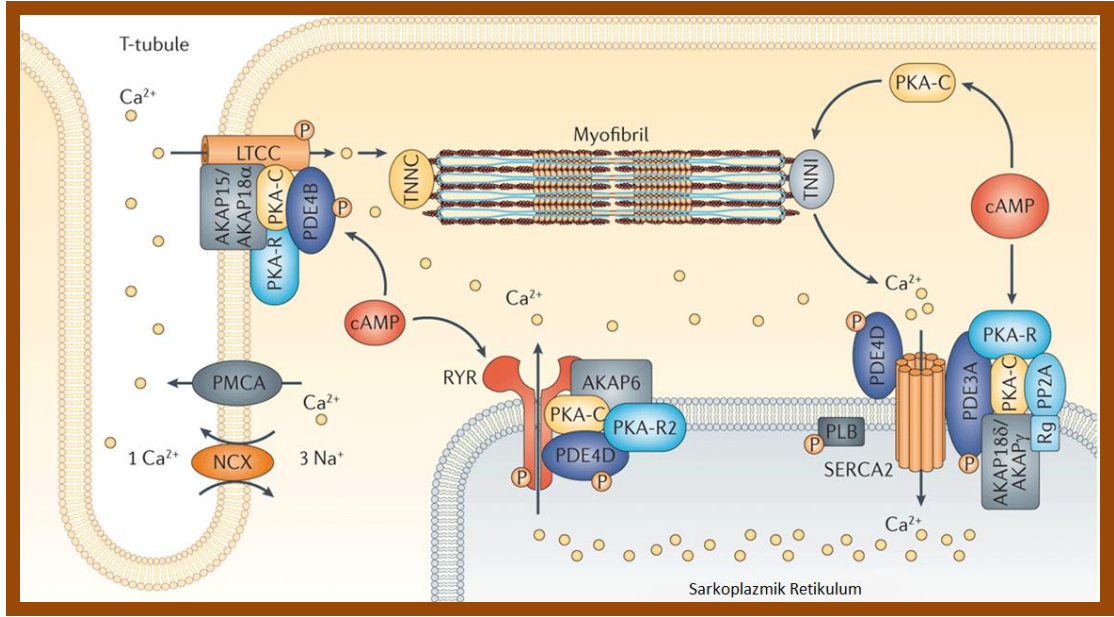
Şekil 1.3. Fosfodiesteraz regülasyonu (Zaccolo ve ark., 2007).

Yapılan çalışmalarda, fosfodiesterazların kinazlar tarafından fosforillenmesi ile fonksiyonlarının düzenlendiğini gösteren bulgulara ulaşılmıştır. PDE1A ve PDE1B

izoenzimlerinin protein kinaz A (PKA) ve Ca^{2+} -Kalmodulin bağımlı kinaz (CaMKII) tarafından fosforillendiğinde, enzimin kinetik parametrelerinde değişiklik olmaksızın, enzimin Ca^{2+} ve kalmoduline olan afinitesinin azaldığı gözlenmiştir. Yine bu enzimlerin kalsiyum kalmodulin bağımlı bir fosfataz olan kalsinörin tarafından defosforile olması ile aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (Conti ve ark., 1995; Manganiello, Murata, ve ark., 1995). Kalsinörin, bir serin/treonin fosfatazdır ve artmış hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu ile aktive olmaktadır. Zhu ve ark. 2010 yılında yayınladıkları makalelerinde, kalsinörinin direkt olarak PDE4D'nin protein ifade düzeyinin ve aktivitesini regüle ettiğini göstermişlerdir. Kalsinörin inhibitörü varlığında PDE4D'nin yarı ömrünün 4 saatten 1 saate düştüğünü gözlemiş ve enzimin degradasyonu üzerinde de kalsinörinin etkisinin olduğunu ifade etmişlerdir (Zhu ve ark., 2010). Araştırmacılar ayrıca kalsinörin ile birlikte kazein kinaz 1/GSK3 β 'nında, cAMP sinyal iletimi üzerine negatif regülasyon gösterdiklerini bildirmişlerdir. PDE4D3'in, N-terminal bölgesinin 54. serin aminoasitinden PKA tarafından fosforillendiği zaman cAMP'yi hidrolize etme etkisinde artış gözlenirken, 13. serin aminoasitinden fosforillendiğinde mAKAP proteinine bağlanma olasılığının arttığı gösterilmiştir (Carlisle Michel ve ark., 2004). Kinazların dışında siklik nükleotitler de PDE'ların modülatörleri olarak bilinmektedir. Örneğin, PDE2 cGMP ile aktive olup cAMP'yi hidrolize eden bir fosfodiesterazdır. Bu modülasyonun, cGMP bağımlı bir yolak ile, enzimin cAMP'ye olan afinitesinin artması sonucunda gerçekleştiği düşünülmektedir. Ortamda düşük konsantrasyonda cGMP bulunduğu deney koşullarında enzim aktivitesinin 2-6 kat arttığı gösterilmiştir (Lugnier ve ark., 1993; Muller ve ark., 1992). Görüldüğü gibi PDE'ların fonksiyonları kinazlar, fosfatazlar ve siklik nükleotitler tarafından modüle edilmektedir. Kalp kası fonksiyon bozukluğunun altında yatan nedenlere fosfodiesterazların katkısını değerlendirirken tüm bu modülatörleri göz önünde bulundurarak olası etkileşimler değerlendirilmelidir.

1.6. Fosfodiesterazların Kardiyak Fonksiyonu ve Ca^{2+} Homeostazı Üzerine Etkileri

Siklik nükleotit fosfodiesterazlar (PDE), ikincil haberci olan cAMP ve cGMP'yi hidrolize ederek hücre içi sinyal yollarında önemli görevler alırlar. PDE aktivitesinin değiştiği durumlarda obezite, insulin direnci, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıkların görüldüğü bilinmektedir (Francis ve ark., 2011; Lugnier, 2006). Etkisi incelenmek istenilen enzimin spesifik inhibitörü kullanılarak yapılan fonksiyon deneyleri, fosfodiesterazların kalpte inotropik ve lusiotropik yanıtlara neden olduğunu göstermiştir. PDE3 inhibitörlerinin kullanıldığı deneylerde PDE3 inhibitörü kullanımıyla bazal Ca^{2+} akım şiddetinde artış gözlenmiştir (Kajimoto ve ark., 1997; Malecot ve ark., 1986; Matsui ve ark., 1999). Araştırmacılar gözlenen bu artışın kanalın iletkenliğinin artmasıyla oluşmuş olabileceğini önermişlerdir. Bir PDE3 inhibitörü olan milrinon uygulamasıyla hücre içi cAMP konsantrasyonunun % 50, Ca^{2+} akımlarının ise % 43 arttığı gösterilmiştir (Olson ve ark., 1987). PDE3 inhibitörlerinin Ca^{2+} akımlarını arttırmalarının yanısıra aksiyon potansiyeli şiddeti, süresi ve kalp atım hızını da arttırdığı gösterilmiştir (Fujino ve ark., 1988). Ayrıca PDE3 inhibitörlerinin SR Ca^{2+} miktarında artışa neden olduğu veya ryanodin duyarlı mekanizma ile Ca^{2+} salınımını arttırarak inotropik yanıt oluşturduğu gösterilmiştir (Holmberg ve ark., 1991; Lancaster ve ark., 1997; Malecot ve ark., 1985; McGarry ve ark., 1994; Morgan ve ark., 1986). PDE inhibitörlerinin SR Ca^{2+} salınımını PKA bağımlı RyR2 fosforilasyonu yoluyla arttırdıkları önerilirken (Hain ve ark., 1995; Perchenet ve ark., 2000), deponun Ca^{2+} miktarında gözlenen artışın ise, PDE3 inhibitörleri etkisiyle aktivitesi artmış olan, PKA'nın fosfolambanı fosforile etmesi sonucunda, Ca^{2+} pompasının üzerindeki fosfolamban inhibisyonunun kalkması ile pompanın sitozolden depoya daha fazla Ca^{2+} taşıması yoluyla olduğu düşünülmektedir (Edes ve ark., 1995; Morgan ve ark., 1986; Yano ve ark., 2000). McGarry ve ark. 1994 yılında yaptıkları çalışmada PDE inhibitörü kullanımının RyR2 kanallarının açılma olasılığını etkileyerek de Ca^{2+} salınımını etkilediklerini öne sürmüşlerdir (McGarry ve ark., 1994).



Şekil 1.4. Fosfodiesterazların hücre içi Ca^{2+} homeostazındaki yeri. NCX; sodyum kalsiyum değiş tokuşcusu, SERCA; sarkoendoplazmik retikulum Ca^{2+} ATPaz, PMCA; plazma membran Ca^{2+} taşıyıcı ATPaz, PP2A; protein fosfat 2A, TNNC; troponin C, TNNI; troponin I (Maurice ve ark., 2014).

PDE3 inhibitörü kullanımında olduğu gibi, PDE4 inhibitörünün kullanımı ile de L-tipi Ca^{2+} akımlarının (LTKK) ve aksiyon potansiyeli ateşleme oranının arttığı rapor edilmiştir (Marcantoni ve ark., 2009). PDE4 izoformunun ratlarda sarkolemma üzerinde (Okruhlicova ve ark., 1996), PDE4D'nin sarkomer Z çizgisinde (Manganiello, Taira, ve ark., 1995), PDE4B'nin LTKK kompleksinde (Leroy ve ark., 2011) ve PDE4D3'ün ise RyR2 makro moleküler kompleksinde lokalize olduğu gösterilmiştir (Lehnart ve ark., 2005). Ayrıca çift boyama deneylerinde PDE4D izoformlarının SR'da lokalize olduğu gösterilmiştir (Verde ve ark., 2001). Bu veriler PDE4 ailesinin kardiyomiyosit kasılma fonksiyonunun düzenlenmesinde aktif rol aldığını düşündürmektedir.

Klinikte PDE inhibitörlerinin kullanımının kalp yetmezliği ve aritmi oluşumuna yol açtığı gözlenmiş ve bu etkinin altında yatan mekanizmalar araştırılmıştır. Bu araştırmalardan biri olan Lehnart ve ark. 2005 yılında yayınladıkları çalışmada PDE4D3'ün RyR2 kompleksi ile beraber bulunduğu ve bu mikro ortamdaki PDE4D3 protein ifadesinin azalması ile PKA aracılı RyR2 fosforilasyonunun arttığı ve dolayısıyla sızıntılı hale gelen kanalın Ca^{2+} çıkışlarını kontrol edemediği ve bu sayede

kardiyak fonksiyon bozukluğunun veya aritmi gözlenme olasılığının arttığını öne sürmüşlerdir (Lehnart ve ark., 2005). Molina ve ark. 2012 ise insan atriyum kasında PDE4'ün cAMP seviyesinin ve bu sayede LTKK'larından Ca^{2+} girişinin kontrol edilmesinde kritik bir rolünün olduğunu ve PDE4 aktivitesinin azalması durumunda aritmi insidansının arttığını göstermişlerdir (Molina ve ark., 2012). Beca ve ark. 2011 yılında yayınladıkları çalışmada PDE4D ifade etmeyen farelerde in-vivo ve ex-vivo kaydedilen bazal kardiyak kasılma fonksiyonlarının, izole kardiyomiyositlerde ölçülen Ca^{2+} transient şiddetlerinin ve SR Ca^{2+} içeriğinin arttığını göstermişlerdir (Beca ve ark., 2011). Araştırmacılar bu örneklerde PLN fosforilasyon düzeylerinin yüksek olduğunu gösterirken RyR2 fosforilasyonlarında anlamlı bir artış görmemişlerdir. Aynı araştırmacıların 2013 yılında yayınladıkları çalışmada ise PDE3A ifade etmeyen farelerde ölçülen parametrelerin PDE4D ifade etmeyen fareler ile paralel değişim gösterdiği sonucundan yola çıkarak, PDE4D gibi PDE3A'nın da SERCA fonksiyonunu regüle ederek bazal kasılmayı modüle ettiği sonucuna varmışlardır (Beca ve ark., 2013). Kardiyomiyositlerde PDE bazal aktivitesinin gösterildiği bir başka çalışmada, sinoatriyal nod hücrelerine IBMX uygulandığında bazal cAMP seviyesinin 9-kat, PKA bağımlı fosfolamban fosforilasyonunu 2-kat ve hücrelerin ateşleme hızlarını % 55 oranında arttığı gösterilmiştir (Vinogradova ve ark., 2008).

PDE'ların hücre herhangi bir uyarım altında değil iken (bazal durum) aktivitelerinin kasılma fonksiyonlarına yansımadağı ancak sıklık nükleotitlerin artışı ile sonuçlanan bir uyarım sonrasında aktivitelerinin arttığını gösteren çalışmalar vardır. Leroy ve ark. 2011 yılında yayınladıkları çalışmada PDE4 ifade etmeyen sıçanlarda elektriksel uyarım altında Ca^{2+} transient genliklerinde fark olmamasına rağmen isoproterenol (ISO; β -AR reseptör agonisti) uygulamasıyla gözlenen floresan şiddet artışının PDE4 proteinini ifade etmeyen sıçanlarda daha fazla olduğu gösterilmiş ve β -AR stimülasyon altında PDE4B'nin LTKK akımları üzerine regülatör etki gösterdiği vurgulanmıştır (Leroy ve ark., 2011). Benzer şekilde Verde ve ark. 1999 yılında yayınladıkları çalışmada PDE1, PDE2, PDE3 ve PDE4 inhibitörlerinin LTKK akımları üzerine etkileri incelenmiş ve genel PDE inhibitörü IBMX uygulamasının bazal Ca^{2+} akımları üzerine % 120 ve cAMP seviyesi üzerine % 70 artış gösterdiği

bulunmuştur (Verde ve ark., 1999). Dört PDE alttipi için ayrı ayrı kullanılan PDE inhibitörleri bazal Ca^{2+} akımları üzerine etki göstermezken, bazal cAMP düzeylerini ancak % 20-30 oranında arttırmıştır. Submaksimal ISO varlığında ise dört PDE inhibitörü de Ca^{2+} akımlarını arttırmıştır. PDE alttiplerinin ISO varlığında gösterdikleri etkinin PDE4>PDE3>PDE2>PDE1 şeklinde olduğu rapor edilmiştir (Verde ve ark., 1999).

1.7. Diyabet Modellerinde Fosfodiesteraz Aktiviteleri

Kaynaklarda deneysel diyabet durumunda gerçekleştirilen PDE çalışması kısıtlı sayıdadır ve mevcut çalışmaların büyük çoğunluğunda insulinin PDE aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmalarda insulinin adipoz (Loten ve ark., 1970) ve kalp dokusundan izole edilmiş cAMP'yi hidrolize eden PDE'ları (Senft ve ark., 1968) aktive ettiği gösterilmiştir. Das ve Chain 1972 yılında yaptıkları çalışmada streptozotosin ile perfüze edilen kalplerde cAMP ve cGMP PDE aktivitelerinin % 25-35 oranında düştüğünü ve insulin perfüzyonunun azalan PDE aktivitelerini anlamlı düzeyde arttırdığını göstermişlerdir (Das ve ark., 1972). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda insulin uyarımının adipositlerde protein kinaz B (Akt) aracılığı ile PDE3 aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Kitamura ve ark., 1999; Wijkander ve ark., 1998). İnsulin PDE aktivitesini arttırdığı gibi PDE'lar da insulin salınımını arttırmaktadır. Yapılan bir çalışmada PDE3'ün spesifik olarak inhibisyonunun pankreas ada hücrelerinden insulin sekresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Parker ve ark., 1995). Pankreas ada hücrelerinde PDE3B yüksek oranda ifade ettirilen mutant farelerde artan insulin sekresyonu sonucunda glukoz intoleransının geliştiği gösterilmiştir (Harndahl ve ark., 2004).

PDE4B ifade etmeyen mutant ve mutasyona uğramamış (kontrol) fareler yüksek yağ-yüksek sükroz içeren diyet ile 4-hafta beslenmişlerdir. Besleme periyodunun sonunda PDE4B ifade etmeyen sıçanların kilo artışlarının ve yağ doku ağırlığının daha az, adipositlerinin daha küçük ve serum leptin düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca mutant farelerde diyet-indüklü

inflamasyonun oluşumunun da azaldığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2009). Sonuç olarak araştırmacılar obezite ile mücadelede PDE4B'nin dikkate alınması gerektiğini vurgulamışlardır.

Şimdiye kadar MetS, obezite, Tip 1 veya Tip 2 diyabet durumlarında PDE'lerin kalp ifade düzeyleri ve aktiviteleri hakkında yapılan tek çalışma olan Nagaoka ve ark tarafından 1998 yılında yayınlanan çalışmada, insulin direncine sahip obez sıçanlarda kardiyak PDE3B mRNA seviyesinin 12. haftada artmış olduğu buna karşın PDE3 ve PDE4 aktivitesinin kontrole göre farklı olmadığı gösterilmiştir (Nagaoka, Shirakawa, Balon, ve ark., 1998).

1.8. Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasının kapsamı iki bölümden oluşmaktadır. İlk olarak % 32 sükröz içeren içme suyu diyetini 16 hafta boyunca uygulamanın Wistar türü sıçanlarda metabolik sendrom deney modelinin oluşumuna neden olduğunu doğrulamak ve bu deney modelinde kardiyak fonksiyon bozukluğunu doku ve hücre düzeyinde gösterebilmek amaçlanmıştır.

Bölüm 1.7'de bahsedilen adipositler ve pankreas hücrelerinde PDE'lar ile insulin salınımı arasındaki ilişki çeşitli çalışmalarda incelenmiştir. Fakat şimdiye kadar metabolik sendrom (MetS) ya da obezite durumundan kardiyak PDE'ların nasıl etkilendiği ve gözlenen patolojilere bu enzim ailesinin katkısının olup olmadığı henüz çalışılmamıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasının ikinci bölümünde, oluşturulan deneysel MetS durumunda kardiyak PDE'ların ifade düzeylerinin, aktivitelerinin ve kalbin kasılma fonksiyonu üzerine etkilerinin elektrofizyolojik ve moleküler biyolojik yöntemler ile incelenmesi amaçlanmıştır (Şekil 1.5).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Sıçanlarda Metabolik Sendrom Deney Modelinin Oluşturulması

Çalışmamızda kullanılan deney hayvanları için Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay raporu alınmıştır (2012-5-35). Deney hayvanları (sıçanlar) Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarından temin edilmiştir. Çalışmalarımızda başlangıç ağırlıkları 180-200 g arasında değişen, 2 aylık Wistar türü erkek sıçanlar tercih edilmiş olup, deney süresi boyunca bu hayvanlar her kafeste 3-adet olacak şekilde, su ve yem kısıtlaması olmaksızın, standart deney hayvanı barınma koşullarında anabilim dalımızda bulunan deney hayvanları barınma ünitesinde tutulmuştur. Çalışmamızda, hayvanlar iki gruba ayrılarak, birinci gruba (kontrol) standart sıçan yemi ve çeşme suyu verilirken, ikinci gruba standart sıçan yemine ek olarak % 32 oranında (935 mM) sükroz içeren çeşme suyu verilerek yüksek karbonhidrat içerikli diyet ile metabolik sendrom (MetS) deney modelinin oluşturulması hedeflenmiştir (Vasanji ve ark., 2006). Bu besleme protokolünü 12 hafta boyunca uyguladığımızda açlık kan şekeri değerlerinin ancak 10. haftadan sonra arttığı gözlemlenmiş ve kalp fonksiyonlarında değişikliklerin olabilmesi için asgari besleme süresi kaynaklar doğrultusunda, 16-haftalık besleme süresi olarak belirlenmiştir (Aguilera ve ark., 2004; Balderas-Villalobos ve ark., 2013; Nunes ve ark., 2013).

2.2. Sıçanlarda Metabolik Sendrom Deney Modelinin Oluşumunun Doğrulanması

Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Diyabet Federasyonu insanlarda metabolik sendrom tanı kriterlerini; glukoz toleransındaki bozulma, insulin direncinin oluşması, serum trigliserit ve insulin miktarlarında artma, arteriyel kan basıncında artma veya serum HDL düzeyinde azalma olarak tanımlamaktadır. Bu kriterlerden en az üç

tanesine sahip olmak metabolik sendrom tanısı için yeterli görülmektedir. Sıçanlarda yüksek karbonhidrat-indüklü metabolik sendrom oluşumunu tespit etmek amacıyla, sıçanlarda oral glukoz tolerans testi ve HOMA indeksi hesaplamaları ile insulin direnç gelişimi, serum insulin ve trigliserit düzeylerinin ölçümü, arteriyel kan basınçları ve serum leptin-ghrelin hormonlarının protein seviyeleri ölçülmüştür.

2.2.1. Oral Glukoz Toleransının ve İnsulin Direncinin Ölçülmesi

Sükroz içeren su ile beslenen hayvanlarda insulin direncinin gelişip gelişmediğini anlamak için, sıçanlara oral glukoz tolerans testi (OGTT) uygulanmıştır. Bu deney için bir gece öncesinden aç bırakılan hayvanlara gavaj yoluyla 1 g/kg miktarında glukoz verilmiştir. Kan örnekleri, glukoz verilmeden önce (0. dk) ve glukoz yüklemesinden sonrası, ilk 15., 30., 60. ve 120. dakikalarda hayvanların kuyruk uçları kesilerek toplanmıştır. Toplanan örneklerin glukoz düzeyleri Accu-Chek glukoz ölçüm cihazıyla ölçülmüştür. Ayrıca klinikte sıklıkla kullanılan “homeostasis model assesment; HOMA” testi sıçanlara uygulanarak sistemik insulin direnci gelişimi araştırılmıştır. Bu test için, açlık kan glukoz ve insulin düzeyleri ölçülmüş, ölçülen bu değerler insulin direnci HOMA-IR formülüne yerleştirilerek sistemik insulin direnci değerlendirilmiştir. ($HOMA-IR = \frac{Açlık\ Glukoz\ (mmol/L) \times Açlık\ İnsulin\ (mU/l)}{22,5}$). Yine aynı veriler kullanılarak pankreas beta hücrelerinin insulin sekresyon oranları HOMA- β ($HOMA-\beta = \frac{20 \times Açlık\ İnsulin\ (mU/L)}{[Açlık\ Glukoz\ (mmoL/L) - 3.5]}$) formülüne koyularak değerlendirilmiştir (Shpilberg ve ark., 2012).

Serum insulin düzeyleri, SPI-bio marka ve A05105 katalog numaralı, enzimle bağlanmış immün deneyi (enzim-immunoassay) gerçekleştirmek üzere tasarlanan bir ticari kit kullanılarak ölçülmüştür. Bu kitin çalışma prensibi kısaca şöyledir; işaretlenmemiş (örnekten gelen) insulin molekülü ve asetilkolinesteraz ile işaretlenmiş insulin molekülü (kit içerisinde bulunan), kısıtlı sayıda ve deney ortamına sabitlenmiş insulin antikoruyla yarışmalı olarak bağlanır. Asetilkolinesteraz Ellman reaktifi ile reaksiyona girerek sarı renkli bir bileşik oluşturur.

Spektrofotometre ile ölçülen renk yoğunluğu, işaretlenmiş insulinin deney ortamındaki insulin antikoruna bağlanmasıyla doğru, örnekten gelen işaretlenmemiş insulinin aynı antikora bağlanması ile ters orantılıdır. Örneklerdeki insulin miktarı her bir deney ortamının (96 well plate, kuyu) renk yoğunluğu insulin standartının renk yoğunluğuna göre karşılaştırarak bağıl olarak tayin edilmiştir.

2.2.2. Serum Triglicerit Düzeylerinin Ölçülmesi

Yüksek sükroz içerikli diyet ile 16 hafta boyunca beslediğimiz sıçanlarda metabolik sendrom oluşumunu tespit etmek amacıyla, besleme protokolü sonunda sıçanlardan toplanan serum örneklerinde trigliserit seviyeleri ölçülmüştür. Ölçümde Cayman marka (10010303 kod numaralı) kolorimetrik kit kullanılmıştır. Bu kitin çalışma prensibi kısaca şöyledir; serum örneklerinde bulunan trigliserit molekülleri kit içeriğinde bulunan lipaz enzimi ile gliserol ve serbest yağ asitlerine parçalanır. Açığa çıkan gliserol, gliserol kinaz enzimi tarafından fosforillenerek gliserol-3-fosfat oluşur. Oluşan gliserol-3-fosfatın, gliserol fosfat oksidaz tarafından okside edildiği reaksiyon sonucunda dihidroksiasetonfosfat ve hidrojen peroksit açığa çıkar. Peroksidazın katalizlediği bir reaksiyon ile hidrojen peroksit, 4-aminoantipirin ve etilanzidinin molekülleri ile redoks tepkimesine girer ve bu tepkime sonucunda mor renkli bir madde oluşur. Renk yoğunluğu örnekteki trigliserit miktarı ile doğru orantılıdır. Deney gruplarından elde edilen renk yoğunluk sinyalleri trigliserit standartından elde edilen sinyaller ile birlikte değerlendirilerek örneklerdeki trigliserit miktarları ölçülmüştür.

2.2.3. Hemodinamik Parametrelerin Ölçümü

Uyguladığımız deney modelinden hemodinamik parametrelerin etkilenme düzeylerini değerlendirebilmek için “tail cuff” yöntemi (NIBP200-A noninvaziv tansiyon ölçüm aleti, BIOPAC) ile kuyruktan kan basınç ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bunun için sıçanlar vücut hareketlerini kısıtlayan ve “holder” olarak adlandırılan bir sabitleyici alan içine alındıktan sonra holder, sıcaklığı 32°C olan bir kabine

yerleştirilmiştir. Kabinin dışına küçük bir açıklıktan çıkarılan kuyruklara “tail cuff sensörü” takıldıktan sonra sıçanların 1-sa boyunca bu şekilde tutularak ortama alışmaları ve kan basınçlarının normale dönmesi beklenmiştir. Hayvanlar sakinleştikten ve damarları ortam sıcaklığına bağlı olarak kayıtlanabilir duruma geldikten sonra arter-kan basıncı ölçülmüştür. Bu düzenekte sıçanların sistolik kan basınçları ile kalp atım hızları kaydedilmiştir.

2.2.4. Serum Leptin ve Ghrelin Hormon Protein Düzeylerinin Western-Blot Tekniği ile Ölçülmesi

Metabolik sendrom olgusunu oluşturmayı hedeflediğimiz sıçanlarda serum leptin ve ghrelin düzeyleri, metabolik sendromun sistemik parametreleri olarak düşünülerek Western-blot yöntemi ile protein düzeyleri ölçülmüştür. Bunun için ilk olarak, sıçanlardan toplanan serum örneklerinin protein miktarları Bradford yöntemi ile spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Daha sonra ilgilenilen protein miktarlarının ölçümü için Western-blot yöntemi uygulanmıştır. Elektroforez prensibine dayalı olarak çalışan bu yöntemde, kimyasal ajanlarla negatif yükle yüklenmiş ve primer yapılarına indirgenmiş proteinler elektrik alan altında pozitif kutuba doğru göç ettirilir ve moleküler ağırlıklarına göre, deney ortamı olan, gözenekli jel ortamında (SDS-PAGE) farklı bölgelerde (kDa olarak) konumlanırlar. Daha sonra, jelde ayrılmış olan bu proteinler elektrik alan etkisiyle PVDF membrana aktarılır edilir ve bu aşamadan sonra ilgilenilen proteine spesifik antikorlar (Santa Cruz biyoteknoloji) kullanılarak bu proteinlerin örnek içerisindeki miktarı hakkında bilgi edinilir.

2.3. Metabolik Sendromlu Sıçanlarda Sistemik Oksidan ve Antioksidan Seviyelerinin Ölçülmesi

Uyguladığımız yüksek karbonhidrat içerikli diyet prosedürünün metabolik sendrom oluşturma potansiyelini ve oluşan sendromda hangi parametrelerin hastalık patofizyolojisine katkıda bulunduğunu anlamayı amaçladığımız bu çalışmada,

sıçanların serum oksidasyon durumlarını ölçmenin çalışmalarımıza yol göstereceği düşüncesi ile serum örneklerinde “total antioksidan durum” ve “total oksidan durum” ölçülmüştür. Bunun için Rel Assay Diagnostic firması tarafından üretilen RL0017 kod numaralı “Total Antioxidant Status Assay Kit (TAS)” ve RL0024 kod numaralı “Total Oxidant Status (TOS)” kolorimetrik kitleri kullanılmıştır. Kısaca kitlerin çalışma prensipleri şöyledir; TAS deneyinde sıçanlardan toplanan serum örneğinin içerisindeki antioksidanlar, deney ortamına eklediğimiz mavi-yeşil renkli ABTS⁺ radikalini renksiz formdaki ABTS molekülüne indirger. 660 nm dalga boyundaki absorbans değeri örneğin toplam antioksidan seviyesi ile ters orantılıdır. Deney, vitamin E analogu olarak bilinen bir antioksidan olan Trolox ile kalibre edilmiştir. TOS deneyinde ise serum örnekleri içerisindeki oksidanlar, deney ortamına eklediğimiz ferröz iyon çelatör kompleksini ferrik iyon haline okside eder. Oluşan ferrik iyonlar deney ortamında bulunan kromojen ile renkli bir bileşik oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülen renk yoğunluğu örnekteki oksidan molekülleri ile doğru orantılıdır. Deney bilinen bir oksidan bileşiği olan hidrojen peroksit ile kalibre edilmiştir.

2.4. Yüksek Sükroz ile Beslenen Sıçan Kalplerinin Histolojik Değerlendirmesi

Yüksek sükroz ile beslenmiş sıçanların kalp dokularında yapısal değişimleri incelemek amacıyla Fakültemiz Histoloji-Embriyoloji A.B.D’nin yardımlarıyla ışık mikroskobu ile histolojik incelemeler yapılmıştır. Bu değerlendirmeler için % 10’luk tamponlu formalin (pH: 7,35) çözeltisinde tespit edilen kalp dokuları sırasıyla dereceli alkollerden geçirilerek dehidratasyona uğratılmış ve saydamlaşmaları için ksilene aktarılmıştır. Saydamlaşan dokular 60°C etüvde 1-sa boyunca % 50 ksilen - % 50 parafin çözeltisinde daha sonra da 4-sa parafin çözeltisinde inkübe edilmiştir. Etüv dışına çıkarılıp parafine gömülen dokular -18°C’de dondurulduktan sonra bir mikrotom ile (Leica RM 2125RT model) doku örneğinin uzun eksenine paralel olacak şekilde 4 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler, miyositleri görüntülemek amacıyla Hematoksilin Eozin (HE), miyokardiyumda bağ doku durumunu görüntülemek amacıyla ise Masson’un Trikrom boyası (MT) ile

boyanmıştır. Ayrıca alınan örneklerin bir kısmı dokulardaki yağ birikimini tespit edebilmek amacıyla Oil Red-O boyası ile boyanmıştır. Bu boyama için doku kesitleri, % 4'lük PFA (paraformaldehit) çözeltisinde oda sıcaklığında 24-sa fikse edildikten sonra 1,2 M süktroz ve % 0,1 PFA içeren çözeltide (+4°C'de) bir gece bekletilmiş ve kriyokasetlerin üzerine kriyomatrikse gömülmüştür. Axioscope A1 model (Carl-Zeiss) ışık mikroskopuyla incelenen kesitler AxioCam MRc5 (Carl Zeiss) dijital görüntüleme sistemi ile fotoğraflanmıştır. Kardiyomiyosit çapları HE ile boyanmış kalp dokularının enine kesitlerinden ölçülmüştür. Bu ölçüm için her hayvana ait preparatlardan rastgele biri seçilerek x40 objektif büyütmesinde 5 farklı alanda 10'ar kas lifi alanı ölçümü olmak üzere, toplamda her hayvana ait 50 ölçümün aritmetik ortalaması alınmış ve daha sonra gruplardaki hayvanlara ait genel ortalamalar hesaplanmıştır.

2.5. İzole organ çalışmaları: Sol Ventrikül İçi Basınç Ölçümü

Deney süresini tamamlayan sıçanlar, heparinli pentobarbital ile (30 mg/kg) anestezi edildikten sonra kalpleri hızlı bir şekilde çıkarılarak önceden gazlandırılmış (% 95 O₂ ve % 5 CO₂ ile) Krebs-Hensleit çözeltisi [(mM olarak): NaCl 119; KCl 4,8; CaCl₂ 1,8; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 20; glukoz 10 ve pH: 7,4] içerisine alınmıştır. Kalpler, çevre bağ dokularından temizlendikten sonra Langendorff perfüzyon sistemine asılmış ve perfüzyon hızı 6 mL/dk. ve ortam sıcaklığı 37°C olacak şekilde ayarlanmıştır. Deneye başlamadan önce sinoatriyal nod ezilerek kalbin kendiliğinden ritim üretmesi engellenmiş, yalnızca dışarıdan uygulanan elektriksel uyarım ile kasılma yanıtlarının oluşması sağlanmıştır. İzole kalbin kasılma gücü, sol ventrikül içine yerleştirilen içi sıvı dolu bir balon ile, basınç değişimleri olarak ölçülmüştür. Bir katater aracılığıyla basınç çevirecine bağlı olan balonun iç basıncı 20 mmHg olacak şekilde ayarlanarak bir ön yük oluşturulmuştur. Deney gruplarından disekte edilen kalpler, aort ve apeks kısımlarından elektrotlar ile bağlanarak, frekansı 300 atım/dk olacak şekilde genliği 30 V, süresi 1,5 ms olan kare biçimli bir sinyal ile elektriksel olarak uyarılmıştır. Bu koşullar altında, kalplerin sol ventrikül içi basınç değerleri 200 Hz örnekleme hızıyla, bir basınç çevireci ve bir A/D dönüştürücü yardımıyla kaydedilmiştir. Balon içinde uyarı ile oluşan basınç

değişiklikleri intraventriküler izovolumetrik basınç değişikliklerini temsil etmektedir. Bu veriler kullanılarak sol ventrikül basınç değişimleri (SVB), sol ventrikül diyastol sonu basınçları (SVDSB), basınç değişim hızları ($\pm dP/dt$) ve bu değişimlerin zaman desenleri [sarsı eğrisinin tepeye ulaşma süresi (TP) ve maksimum genliğin %50'sine iniş süresi (DT_{50})] incelenmiştir.

2.6. İzole doku çalışmaları: Papiller Kas İzometrik Kasılmalarının Ölçülmesi

Papiller kas kasılma ve gevşeme yanıtlarının inceleneceği deneyler için sıçanlar heparinli pentobarbital ile (30 mg/kg) anestezi edildikten sonra kalpleri hızlı bir şekilde çıkarılarak önceden gazlandırılmış (%95 O_2 ve % 5 CO_2 ile) Krebs-Hensleit çözeltisi [(mM olarak): NaCl 119, KCl 4,8, $CaCl_2$ 1,8, $MgSO_4$ 1,2, KH_2PO_4 1,2, $NaHCO_3$ 20 ve glikoz 10, pH:7,4] içerisine alınmıştır. Papiller kaslar dikkatli bir şekilde izole edildikten sonra, kas bir ucundan iğne elektrot ile banyo tabanındaki muma sabitlenirken, diğer ucu bir kuvvet çevirecine (Grass FT03) bağlanmış ve Krebs-Hensleit solüsyonu ile perfüze ($37^{\circ}C$) edilmiştir. Bir maksimum-altı gerilmenin elde edilebildiği gerilme değerine getirilen kas preparatlarının, tonusunun kararlı bir duruma gelmesi için yaklaşık 30-dk beklendikten sonra, bir stimülatör aracılığı ile (Grass S48) 3-ms ve 0,2 Hz frekansa sahip kare biçimli elektriksel uyarı ile uyarılarak papiller kas şeritlerinde elektriksel uyarı ile sarsı eğrileri (kasılma-gevşeme) elde edilmiştir. Kasılma yanıtları bir ön amplifikatör (Grass P16) aracılığı ile 1000-kat büyütüldükten sonra analog sinyaller bir analog-dijital çevirici (Adventech PCL-818 PG) aracılığı ile 10-kHz örnekleme hızında dijital ortama kaydedilirken, eş zamanlı olarak monitorize edilmiştir. Sarsı eğrilerinin kinetik analizi, Microsoft Excell programı ile hazırlanan bir analiz algoritması ile gama-dağılım fonksiyonuna uydurularak gerçekleştirilmiştir. Sarsı eğrilerinin bazal değerden çıkarılarak ölçülen tepe değeri (net kasılma değeri olarak), tepeye çıkış süresi (TP) ve maksimum değer %50'sine iniş süresi (DT_{50}) ölçülerek gruplar arasında karşılaştırma parametreleri olarak kullanılmıştır.

Fosfodiesteraz (PDE) inhibitörlerinin papiller kası kasılma-gevşemesi üzerine etkilerini incelediğimiz deney protokollerinde, öncelikli olarak elektriksel uyarı ile indüklenen kasılmalar üzerine, PDE inhibitörlerinin etkileri incelenmiştir. Bunun için yaklaşık 5-dk elektriksel olarak uyarılan ve kasılma genliği kararlı duruma gelen kas dokusuna ya PDE4 inhibitörü rolipram (10^{-5} M), ya PDE3 inhibitörü milrinon (10^{-6} M) ya da genel PDE inhibitörü olan IBMX (10^{-5} M) süperfüze edilerek, bu inhibitörlerin kasılma-gevşeme fonksiyonları üzerine etkileri ölçülmüştür.

Kaynaklarda PDE inhibitörlerinin etkilerinin daha çok adrenerjik uyarım altındayken önem kazandığını vurgulayan çalışmalar mevcuttur (Afzal ve ark., 2011; Jurevicius ve ark., 2003; Leroy ve ark., 2011; Mika ve ark., 2013; Weninger ve ark., 2013). Bu nedenle papiller kas dokusu elektriksel olarak kasılırken adenilat siklaz aktivatörü forskolin (10^{-6} M) ile doku uyarılmıştır. Forskolin etkisi ile gözlenen inotropik yanıtın kararlı bir değere ulaşmasını takiben (yaklaşık 5-dk.), PDE4 inhibitörü rolipram (10^{-5} M), PDE3 inhibitörü milrinon (10^{-6} M) veya genel PDE inhibitörü IBMX (10^{-5} M) ortama uygulanarak bu inhibitörlerin forskolin yanıtını arttırma düzeyleri gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

2.7. Kardiyomiyositlerin İzolasyonu

Sıçanlar, 16-haftalık deney süresi sonunda, hafif anestezi altında iken (30 mg/kg sodyum pentobarbital) kalpleri hızlı bir şekilde çıkarılıp, soğuk ve Ca^{2+} suz fizyolojik bir çözelti içerisine konularak, kollajenaz (1,2 mg/mL) perfüzyonu ile hücre izolasyonu yapılmıştır (Yaras ve ark., 2005). Kısaca; Langendorff düzeneği yardımıyla aorttan ters perfüzyon yöntemi ile önce içeriği; (mM olarak) NaCl 130, 5,4 KCl, 1,4 MgCl_2 , 0,4 NaH_2PO_4 , 5 HEPES, 10 glikoz ve 20 Taurin, pH 7,4 olan ve % 100 O_2 ile gazlandırılan, Ca^{2+} suz perfüzyon çözeltisi ile 5-dk boyunca perfüze edildikten sonra, kollajenaz içeren çözelti ile yaklaşık 25-dk boyunca perfüze edilmiştir. Enzim perfüzyonu sonrasında kalp bağ dokusunu oluşturan kollajen proteinleri arasındaki bağlar zayıflatılmış ve bu işlemi takiben makas yardımıyla mekanik olarak kalbi küçük parçalara ayırmak ve uygun por çaplı filtreden geçirerek

kardiyomiyositleri tek tek izole etmek mümkün olmuştur. Perfüzyon süresinin bitiminde sistemden alınan kalp dokusu Ca^{2+} içermeyen perfüzyon solüsyonu içerisine alınmış ve mekanik olarak küçük parçalara ayrılmıştır. Daha sonra, ince bir filtreden geçirilerek hücreler bir tüpün içerisine alınmış ve izole edilen hücreler 37°C 'de, çözeltideki son Ca^{2+} miktarı 1,5 mM olacak şekilde kademeli olarak 0,3-0,5-1mM Ca^{2+} içeren çözelti ile yıkanarak ölü hücrelerden arındırılmış ve deneye hazır hale getirilmiştir.

2.8. L-tipi Ca^{2+} Kanal Akımlarının Ölçümü

L-tipi Ca^{+2} kanal akımları (LTKK) tüm hücre voltaj-kenetleme konfigürasyonunda 1,5-2 $\text{M}\Omega$ 'luk elektrotlar kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler için kullanılan pipet çözeltisi içeriği şu şekildedir (mM); 110 Cs-aspartat, 20 CsCl, 1MgCl₂, 5 fosfokreatin- Na_2 , 5 ATP- Na_2 , 10 EGTA ve 5 HEPES (pH=7,4). Akım kayıtları için, hücre membran potansiyeli -80 mV voltaj değerine getirildikten sonra eğimli bir voltaj uygulaması ile zar potansiyeli -45 mV'a kenetlenmiş, bu seviyede bir süre beklenerek voltaj kapılı Na^{+} -kanal akımları bloke edilmiştir. Sonra hücrelerden -50 mV'tan başlamak üzere 10 mV'luk artışlarla +60 mV'a 300-ms süreli depolarize edici pulslar uygulanarak 12 farklı voltaj seviyesinde akım kayıtları alınmış ve bilgisayara online kaydedilerek Clampfit 8.0 programı ile analiz edilmiştir. Ölçülen tepe değerleri 200-ms'nin sonundaki kuyruk akımlarından çıkarılmıştır. Her potansiyel değeri için elde edilen akımın voltaja göre değişim grafiği oluşturularak gruplar arasında karşılaştırma yapılmıştır. Ayrıca, her hücrenin kapasitans değerleri deney başında kaydedilmiştir.

2.9. Hücre İçi Global Ca^{2+} Değişimlerinin (Transientlerinin) Ölçümü

Hücre içi Ca^{2+} ölçümlerinin yapılabilmesi için izole edilen kardiyomiyositler Fura-2 AM (4 μM) ile oda sıcaklığında 30-dk inkübe edilerek boyanmıştır. Fura-2 boyası hücre içi serbest Ca^{2+} afinitesi yaklaşık 100 nM olan ratiometrik bir boyadır. 340 nm

ile 380 nm dalga boylarında uyarılarak 520 nm dalga boyunda emisyon yaymaktadır. Bu boya yardımıyla hücre içi serbest Ca^{2+} ölçümü yapabilmek için mikrospektrofotometre cihazı kullanılarak tek hücreden kayıt alınmıştır. Hücre içi serbest Ca^{2+} ölçüm deneylerinde kullanılan banyo çözeltisinin içeriği şu şekildedir (mM olarak) NaCl 130, KCl 4,8, MgSO_4 1,2, CaCl_2 1,5, KH_2PO_4 1,2, HEPES 10 ve glikoz 10 (pH= 7,4). İki ucuna elektrot yerleştirilmiş kuvvet içerisine alınan hücrelerden uyarılabilir olanı seçilerek bir pencere içine alınıp önce 20-s’lik bazal Ca^{2+} sinyali kaydedilmiş, sonra hücreler 25-30 V’luk sinyal ile 0,2 Hz frekansında uyarılarak 200-s süreyle hücre içi geçici Ca^{2+} değişimleri (Ca^{2+} transient) kaydedilmiştir. Arkasından aynı pencere banyonun hücre bulunmayan bir bölgesine odaklanarak bir süre kayıt alınıp elde edilen sinyal değeri hücre içi sinyalden çıkarılmıştır. Böylece, banyo ortamının floresanından kaynaklanabilecek gürültü ortadan kaldırılmıştır. Gözlenen Ca^{2+} değişimine ait sinyallerin ölçümü PTI RatioMaster marka mikrospektroflorimetre ile yapılarak Felix (PTI) programı ile bilgisayara kaydedilip değerlendirilmiştir. Transientlerin kinetik analizi Microsoft Excell programı ile hazırlanan bir analiz algoritması ile gama dağılım fonksiyonuna uydurularak gerçekleştirilmiştir. Ca^{2+} sinyallerinin bazal değerden çıkarılarak ölçülen tepe değeri [Maksimum floresan şiddeti ($\Delta F_{340/380}$)], tepeye çıkış süresi (TP) ve maksimum değer %50’sine iniş süresi (DT_{50}) ölçülerek gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

Fosfodiesteraz (PDE) inhibitörlerinin Ca^{2+} transientleri üzerine etkilerini incelediğimiz deney protokollerinde öncelikli olarak elektriksel uyarı ile indüklenen transientler üzerine PDE inhibitörlerinin etkileri incelenmiştir. İzole kardiyomiyositler elektrik alan uyarımıyla uyarılarak hücre içi Ca^{2+} transientlerinin oluşumu indüklenmiş ve bir süre kayıtlandıktan sonra (yaklaşık 3-dk) deney ortamına PDE4 inhibitörü rolipram (10^{-5} M), PDE3 inhibitörü milrinon (10^{-6} M) veya genel PDE inhibitörü IBMX (10^{-5} M) eklenerek, elektriksel olarak uyarılan Ca^{2+} transientleri üzerine fosfodiesteraz inhibitörlerinin etkileri kayıt edilmiştir.

Adenilat siklaz aktivatörü forskolin (10^{-6} M) uygulamasının kontrol ve metabolik sendrom durumunda Ca^{2+} transientleri üzerine gösterdiği etkilerin karşılaştırmalı

olarak değerlendirildiği deneylere ek olarak PDE inhibitörlerinin oluşmuş adrenerjik yanıt üzerine etkileri de PDE4 inhibitörü rolipram (10^{-5} M), PDE3 inhibitörü milrinon (10^{-6} M) veya genel PDE inhibitörü IBMX (10^{-5} M) ortama uygulanarak değerlendirilmiştir.

2.10. Dinlenme Durumundaki Kardiyomiyositlerde Lokal Ca^{2+} Salınımlarının (Ca^{2+} spark) Ölçülmesi

Enzimatik yolla izole edilen kardiyomiyositler, içeriği (mM olarak) NaCl 117, KCl 5,4, MgCl_2 1,7, NaH_2PO_4 1, CaCl_2 1,8, glikoz 10, ve HEPES 10 (pH 7,4) olan tampon çözeltisine aktarılmıştır. Kardiyomiyositler 4 μM Fluo-3 AM ile karanlık ortamda 35-dk inkübe edildikten sonra 3-kez tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Deney ortamına alınan kardiyomiyositlerin cam tabana tutunması beklendikten sonra, hiçbir uyarıya maruz bırakılmayan dinlenme durumundaki hücrelerden Leica TCS SP5 lazer konfokal mikroskobu yardımı ile doğrusal tarama (x-t boyutunda) modunda floresan sinyaller kaydedilmiştir. Hücreler 488 nm dalga boyunda, argon lazer ile uyarıldıktan sonra 530 nm dalga boyunda emisyonları toplanmıştır. Taranan doğru (512 piksel) miyositlerin uzun eksenine gelecek şekilde ayarlanmıştır. Her görüntü, 800 Hz hızında, 63X su immersiyonlu ($\text{NA}=1,3$) objektif yardımıyla oda sıcaklığında ($20-22^\circ\text{C}$) kaydedilmiştir. Konfokal pinhol 1-1,5 airy birime ayarlanmıştır. Kaydedilen spark ölçüm resimleri ImageJ programı tabanlı olarak çalışan Spark Master programı ile analiz edilmiştir. Analiz programı yardımıyla sinyalin maksimum değeri ($\Delta F/F$), tepeye çıkış süresi (TP), sinyalin uzayda kapladığı alanın yarısı (FWHM) ve maksimum değerin yarısına iniş süresi (FDHM) analiz edilmiştir. Bu ölçümleri takiben, kaydedilen resimlerde sparklar sayılarak her resim için birim uzunluk (μm) ve saniyede, spark frekans değerleri hesaplanmıştır.

PDE inhibitörlerinin Ca^{2+} sparkları üzerine etkileri değerlendirmek amacıyla PDE4 inhibitörü rolipram (10^{-5} M), PDE3 inhibitörü milrinon (10^{-6} M) veya genel PDE inhibitörü IBMX (10^{-5} M) varlığında Ca^{2+} spark parametreleri kaydedilmiştir.

2.11. Sarkoplazmik Retikulum Ca^{2+} Salma ve Geri Alma Fonksiyonlarının Ölçülmesi

İzole kardiyomiyositler Fura-2 (AM; 4 μM) ile oda sıcaklığında 30-dk inkübe edildikten sonra 340 nm ve 380 nm'de uyarılıp 520 nm'de emisyon değerleri kaydedilerek hücre içinde meydana gelen anlık Ca^{2+} değişimleri ölçülmüştür. Sarkoplazmik retikulum (SR) Ca^{2+} miktarını belirlemek amacıyla hücrelere 10 mM kafein uygulanmıştır. Bu konsantrasyonda kafein, SR'dan Ca^{2+} salınım görevini yapan ryanodin reseptör kanallarını aktive etmektedir. Kafein uygulamasından önce, hücre elektrik alan uygulaması ile 0,2 Hz'de 1-dk boyunca uyarılmış, elektriksel uyarı kesildikten 1-dk sonra ortama 10 mM kafein eklenerek oluşan Ca^{2+} transienti kaydedilmiştir. Kafein uygulamasına yanıt olarak gözlenen yüksek genlikli Ca^{2+} transienti SR'un içerdiği kalsiyum miktarı olarak yorumlanmıştır. Transientlerin kinetik analizi Microsoft Excell programı ile hazırlanan bir analiz algoritması ile gama-dağılım fonksiyonuna uydurularak gerçekleştirilmiştir. Ca^{2+} sinyallerinin bazal değerden çıkarılarak ölçülen tepe değeri (kafein yanıtı; $\Delta F_{340/380}$), tepeye çıkış süresi (TP) ve maksimum değer % 50'sine iniş süresi (DT_{50}) ölçülerek karşılaştırılmıştır. TP ve DT_{50} değerleri hesaplanırken sırasıyla, transientin oluşma ve tepeye ulaşma fazının ya da tepe değerinden başlangıç değerine geri dönme fazının % 25-50-75-90. değerine ulaşma süreleri hesaplanmıştır.

Tetracaine kullanılarak MetS ve kontrol durumlarında RyR2 Ca^{2+} sızıntı miktarının belirlenebilmesi amacıyla hücreler 1,8 mM Ca^{2+} içeren banyo solüsyonunda 1-dk boyunca elektriksel olarak uyarılarak Ca^{2+} transientleri kayıtlandıktan sonra elektriksel uyarım kesilmiş ve banyo solüsyonu 0 Na^+ 0 Ca^{2+} (banyo solüsyonunda NaCl ve CaCl_2 yerine eşit derişimde NMDG ve 10 mM EGTA bulunmaktadır) içeren banyo solüsyonuna değiştirilmiş ve ortama 1 mM tetracaine uygulanmıştır. Tetracaine uygulamasından sonra yaklaşık 3-dk beklenmiş ve tetracaine etkisinin stabil bir değere ulaşması sağlanmıştır. Daha sonra ortamdaki tetracaine uzaklaştırılarak 0 Na^+ 0 Ca^{2+} içerikli banyo solüsyonuna 10 mM kafein uygulanmıştır. Kafein uygulaması ile gözlenen Ca^{2+} floresan şiddetinin artış miktarı,

tetracaine uygulaması ile gözlenen bazal Ca^{2+} floresan şiddetinin azalış miktarına oranlanarak hücredeki Ca^{2+} sızıntı miktarı belirlenmiştir.

SR'dan Ca^{2+} salınımı RyR2'leri tarafından olurken salınan Ca^{2+} 'un tekrar SR içerisine alınması sarko/endoplazmik Ca^{2+} -ATPaz (SERCA) tarafından gerçekleştirilmektedir. Ca^{2+} transientlerinde sinyalin sönümlenme aşaması yani artmış sitoplazmik Ca^{2+} miktarının başlangıç koşullarına dönmesi temel olarak NCX (Na-Ca değiştokuşcusu) ve SERCA fonksiyonu ile sağlanmaktadır. Deney grupları arasında SERCA aktivitesini karşılaştırmalı olarak incelemek istediğimiz deney protokolünde ortamdan Na^+ ve Ca^{2+} 'u uzaklaştırarak NCX etkisini elimine edilmiş ve kafein uygulaması ile oluşan Ca^{2+} transientinin sönümlenme devresinin yarısına ulaşma süresi (DT_{50}) hesaplanarak ilgili hücrenin SERCA aktivitesi hakkında fikir elde edilmiştir (Balderas-Villalobos ve ark., 2013).

2.12. Western-blot Tekniği ile Protein Seviyesi Ölçümleri

Sıçanlardan izole edilen kalp dokuları sıvı nitrojen yardımıyla pulverize edildikten sonra her kalpten eşit miktarda doku tartılarak homojenizasyon tampon çözeltisi (mM olarak) Tris-HCl (pH 7,4) 20, NaCl 150, KCl 2, EDTA 2, DTT 0,5, Proteaz inhibe eden çözelti 100, PMSF 0,4 %2 NP-40 ve %1 sodyum deoksikolat ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon işlemi için önce ultraturaks aleti ile mekanik parçalama daha sonra ise santrifüj (10,000 rpm 10-dk $+4^{\circ}\text{C}$ 'de) yöntemiyle proteinlerin diğer hücre kısımlarından ayırt edilmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrasında süpernatant hem sitoplazmik hem de membran proteinlerini içeren bir süspansiyon halinde elde edilmiş ve tüm çalışmalar bu kısımda yapılmıştır. Western-blot yöntemine geçmeden önce her bir örnekte bulunan protein miktarları Bradford protein miktar tayini yöntemi ile tespit edilmiştir (Bradford, 1976). Oldukça duyarlı olan bu yöntem (5-100 $\mu\text{g/mL}$); organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek, renk oluşturmasını esas alır. Yöntemde temel prensip, boyanın proteine bağlı değil iken 465 nm'de maksimum absorbans verirken, protein

ile bağlandığı zaman 595 nm dalga boyunda maksimum absorbands vermesidir. Dolayısıyla 595 nm dalga boyundaki absorpsiyon miktarı örnekteki protein miktarı ile doğru orantılıdır. Absorbans miktarı ile protein miktar hesabını yapabilmek için albumin protein standart grafiği oluşturularak her bir örnekteki protein miktarları hesaplanmış ve ilgilenilen proteinlerin gruplar arasında miktar karşılaştırmalarını yapmak üzere Western-blot yöntemine geçilmiştir.

Ryanodin reseptör proteini haricinde kalan tüm protein ölçümleri için, protein miktarları eşitlenmiş olan örnekler %8-15 por çaplı SDS-PAGE jellere yüklenmiş ve 150 V'luk sabit voltaj altında 2-3 sa yürütülmüştür. Daha sonra proteinler 200 mA sabit akım altında 1 sa süresince PVDF membrana transfer edilmiştir (Laemmli, 1970). Ryanodin reseptörü % 5 por çaplı jelde 150 V sabit voltaj uygulaması altında 8-sa elektroforez edilmiştir. Transfer aşamasından (30 V, gece boyu) sonra spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için membranlar % 3 oranında albumin içeren TTBS solüsyonunda (% 0,1 Tween-20, 10 mM Tris ve 150 mM NaCl) 1-sa hafif düzeyde sallanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodundan sonra membranlar 10-dk boyunca 3-kez TTBS solüsyonu ile yıkanmıştır. Yıkama işlemlerinden sonra % 3 albuminli TTBS solüsyonu içerisinde hazırlanan birincil antikorlar ile membran bir gece (+4⁰C'de) inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunun sonunda tekrar TTBS solüsyonu ile yıkama protokolü membranlara uygulandıktan sonra ikincil antikor solüsyonları ile membranlar oda sıcaklığında 1-sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunun sonunda tekrar yıkanan membranlar ECL (Enhanced Chemiluminescence) substratı olan luminol ile 1-dk inkübe edildikten sonra görüntüleme hassas X-ışını radyografi filmleri yardımıyla yapılmıştır. Elde edilen protein bant görüntüleri Image J programında dansitometrik olarak analiz edilmiştir. β -Aktin protein seviyesi, deney grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği için (% 4 daha fazla) ilgilenilen protein düzeyleri β -Aktin normalizasyonu gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir. Fosfo-RyR2 (pRyR2; Ser2808 bölgesinde) antikorı Badrilla firmasından diğer RyR2, SERCA, FKBP12.6 (FK506 bağlayan protein), β -Aktin, fosfo-CaMKII (pCaMKII; Thr286 bölgesinde), CaMKII, fosfo-PKA (pPKA; Thr198 bölgesinde), PKA, fosfo-PLN (pPLN; Thr17 bölgesinde), fosfo-PLN (pPLN; Ser16 bölgesinde), PLN, PDE3B, PDE4A, PDE4B, PDE4D,

antikorları Santa Cruz biyoteknoloji firmasından fosfo-PP1A (pPP1A; Thr320 bölgesinde), PP1A, fosfo-PP2A (pPP2A; Tyr307 bölgesinde), PP2A ve ikincil antikorlar ise Abcam firmasından temin edilmiş ve antikor dilusyonları üretici firmaların önerdikleri aralıklarda kullanılmıştır.

PDE inhibitörlerinin protein fosforilasyonları üzerine etkilerini incelediğimiz deneyler için izole edilen kardiyomiyositler içeriği (mM olarak) NaCl 117, KCl 5,4, MgCl₂ 1,7, NaH₂PO₄ 1, CaCl₂ 1,8, glukoz 10, ve HEPES 10 (pH 7,4) olan tampon çözeltisine alınmıştır. Oluşan hücre süspansiyonundan eşit hacimde tüplere alınarak adenilat siklaz aktivatörü forskolin (10^{-6} M), PDE4 inhibitörü rolipram (10^{-5} M), PDE3 inhibitörü milrinon (10^{-6} M) veya genel PDE inhibitörü IBMX (10^{-5} M) ile 15-dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler 1000 rpm de 1-dk santrifüj edildikten sonra üst tarafta kalan sıvı kısım atıldıktan sonra hücreler protein ölçümü ve Western-blot uygulamasına kadar -80°C 'de saklanmıştır.

2.13. cAMP Ölçümü

İzole edilen kardiyomiyositlerin cAMP miktarları Cayman marka 581001 kod numaralı enzim immün-deney kiti ile ölçülmüştür. Kitin çalışma prensibi temel olarak örnekten gelen serbest cAMP ile asetilkolinesteraz (AChE) enzimi ile konjuge halde bulunan cAMP'nin kısıtlı sayıdaki cAMP antikoruna yarışmalı olarak bağlanması prensibine dayalıdır. AChE ile konjuge cAMP'nin antikora bağlanma düzeyi örnekte bulunan cAMP konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Kitin önerdiği örnek hazırlama protokollerine göre kalp dokusu veya izole kardiyomiyositler homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örneklerde protein sayımı Bradford yöntemi ile gerçekleştirildikten ve protein miktarları eşitlendikten sonra tabanı cAMP antikoruna ile kaplı olan 96 kuyucuklu deney ortamına cAMP standartları ve örnekler eklenerek uygun tampon çözelti varlığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunun sonunda AChE enziminin substratını içeren Ellman kimyasalı ortama eklenerek enzimin substratı ile kimyasal tepkimeye girmesi sağlanmıştır. Bu

kimyasal reaksiyon sonucunda 412 nm dalga boyunda absorblanan ve sarı renk yansıtan bir kimyasal ürün oluşmaktadır. Deney sonunda 412 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri yani renk şiddeti ortamdaki AChE ile konjuge cAMP miktarı ile doğru, örnekten gelen serbest cAMP miktarı ile ters orantılı olarak değişmektedir. cAMP standartının konsantrasyon absorbans grafiği dört parametrelili lojistik fonksiyonu uydurulduğunda bu standart grafiğe göre örneklerden ölçülen absorbans değerlerine karşılık gelen cAMP konsantrasyon değerleri belirlenerek her bir örnekte bulunan cAMP miktarı hesaplanmıştır.

PDE inhibitörlerinin hücre içi cAMP düzeyleri üzerine etkilerini incelediğimiz deneyler için izole edilen kardiyomiyositler içeriği (mM olarak) NaCl 117, KCl 5,4, MgCl₂ 1,7, NaH₂PO₄ 1, CaCl₂ 1,8, glukoz 10, ve HEPES 10 (pH 7,4) olan tampon çözeltisine alınmıştır. Oluşan hücre süspansiyonundan eşit hacimde tüplere alınarak adenilat siklaz aktivatörü forskolin (10^{-6} M), PDE4 inhibitörü rolipram (10^{-5} M), PDE3 inhibitörü milrinon (10^{-6} M) veya genel PDE inhibitörü IBMX (10^{-5} M) ile 15-dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler 1000 rpm de 1-dk santrifüj edildikten sonra üst tarafta kalan sıvı kısım atıldıktan sonra hücreler cAMP ölçüm gününe kadar -80°C’de saklanmıştır.

2.14. İstatistiksel Analizler

Tüm deney sonuçları ortalama $\pm$ SEM (standart error of mean) olarak verilmiştir. Ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlılık seviyesi ANOVA (TUKEY post-hoc) veya student t-testi (One tailed) kullanılarak belirlenmiştir. H1 hipotezinin kabul edilmesi için istatistiksel anlamlılık test değeri 0,05’den küçük olarak seçilmiştir.

2.15. Kullanılan Kimyasallar

NaCl, KCl, MgCl₂, NaH₂PO₄, CaCl₂, glukoz, HEPES, MgSO₄, EDTA, DTT, NP-40, PMSF, NMDG, Kafein, Taurin, fosfokreatin-Na₂, ATP-Na₂, sodyum deoksikolat, EGTA, Cs-aspartat, CsCl, Hematoksilen-Eozin, Masson's Trikom, kryomatriks ve Oil Red-O kimyasal maddeleri Sigma (SIGMA-ALDRICH GmbH, Almanya) firmasından satın alınmıştır. Tris, Tween-20, SDS, merkaptotanol, PVDF membran ve Akrilamid-bisakrilamid solüsyonu Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, ABD) firmasından satın alınmıştır. Kolajenaz Worthington (Worthington Biochemical Corporation, ABD) firmasından, IBMX, milrinon, rolipram ve forskolin ise Tocris (Tocris Bioscience, İngiltere) firmasından satın alınmıştır. Fura-2 ve Fluo-3 boyası ise Invitrogen (Invitrogen, ABD) firmasından temin edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Sıçanlarda Deneysel Metabolik Sendrom (MetS) Oluşturulması

3.1.1. Deney Hayvanları ile İlgili Genel Parametreler

Deneysel hayvanlarda başlangıç ağırlıkları 180-200 g arasında değişen, 2 aylık Wistar türü erkek sıçanlar kullanılmıştır. Kontrol grubuna ait sıçanlarda, başlangıç düzeylerine göre 16-hafta yüksek sükröz içeren su ile besleme protokolünün sonunda kilo artışı % 68 oranında iken MetS grubunda kilo artışı % 84'dür. MetS grubundaki ortalama vücut ağırlık artışının kontrol grubuna göre % 10 ($P=0,012$) seviyesinde farklı olduğu bulunmuştur. Bu grubun açlık kan glukoz düzeyinin ise % 34 oranında arttığı gözlenmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Deney hayvanlarının genel parametreleri

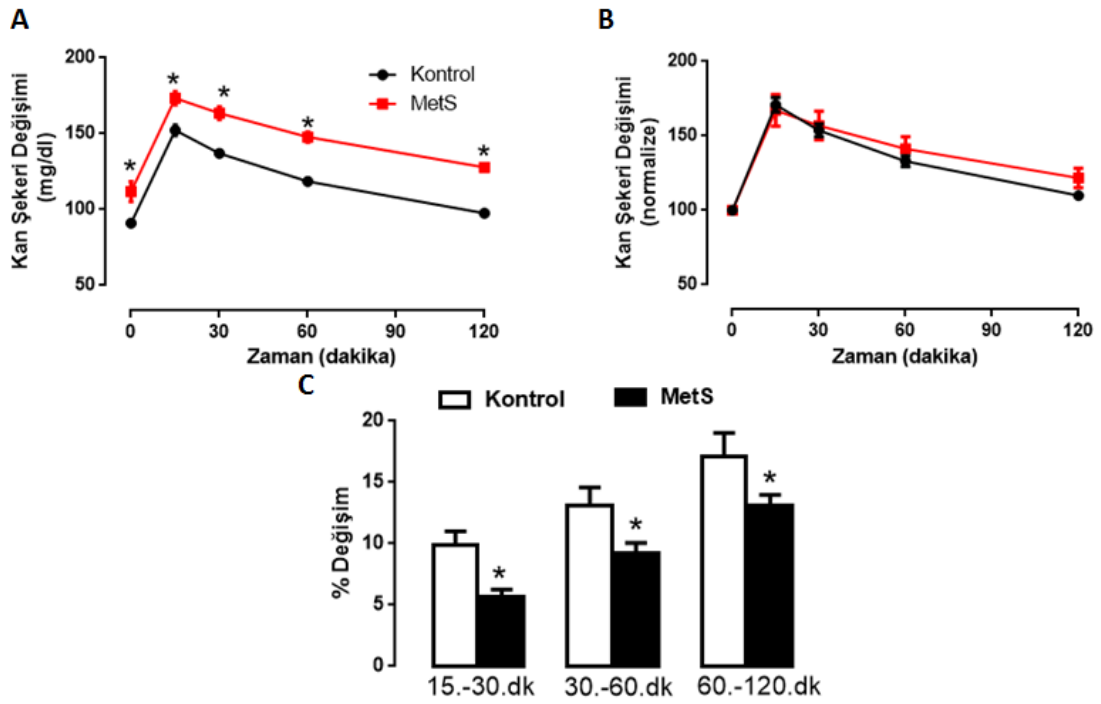
	Kontrol	Metabolik Sendrom	Yüzde Olarak Fark
Vücut ağırlığı (VA) (g) ¹	328±7 (% 68)	360±6* (% 83)	10
Islak kalp ağırlığı (KA)(g) ²	1,5±0,1	2,1±0,1*	40,0
KA/VA ($\times 10^{-3}$) ²	4,3±0,3	5,4±0,5*	25,6
Miyosit çapı (μm) ³	15±0,5	14±0,4	6,1
Zar sığası ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$) ⁴	81±11	79±5	1,1
Kan glukozu (mg/dl) ¹	91±2	122±7*	34
Trigliserit (mg/dl) ²	33±2	44±5*	32
İnsulin (ng/ml) ²	1,7±0,3	3,3±0,3*	94
HOMA-IR ²	9,6±1,6	27,8±3,8*	190
HOMA- β ²	0,543±0,099	0,489±0,086	10
OGTT(EAA) ⁵	592±25	868±37*	47

Ölçüm değerleri ortalama±SEM olarak gösterilmiştir. Kontrole göre * $P<0,05$, (¹ $n_{\text{Kontrol}}=30$, $n_{\text{MetS}}=44$; ² $n_{\text{Kontrol}}=10$, $n_{\text{MetS}}=10$; ³ $n_{\text{Kontrol}}=9$, $n_{\text{MetS}}=8$; ⁴ $n_{\text{Kontrol}}=5$, $n_{\text{MetS}}=6$; ⁵ $n_{\text{Kontrol}}=22$, $n_{\text{MetS}}=33$).

MetS grubunda, ıslak kalp ağırlığı ve kalp/vücut ağırlığı oranının kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($P<0,05$) yüksek olmasına karşın, ortalama olarak kardiyomiyosit çaplarının (mikroskopik kantitasyon) ve zar sızgılarının (patch-clamp yöntemi ile) gruplar arasında farklı olmadığı görülmektedir (Çizelge 3.1).

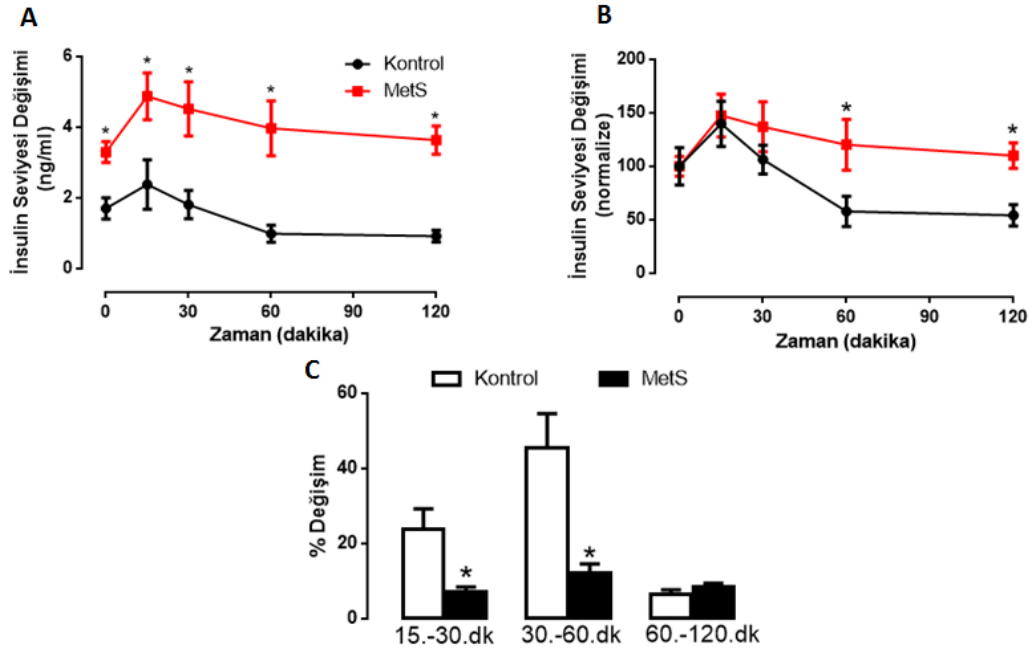
3.1.2. Sıçanlarda Deneysel Metabolik Sendrom Gerçekleşmesinin Doğrulanması

16-hafta boyunca % 32 oranında süktroz içeren çeşme suyu ile beslenen Wistar türü sıçanlarda metabolik sendrom (MetS) deney modelinin oluşumunun doğrulanması amacıyla kan glukoz, insulin, trigliserit miktarları, insulin direnç gelişimi ve arter kan basınçları ölçülmüştür. Yüksek süktroz içerikli diyet ile beslenen sıçanlarda serum trigliserit miktarı kontrol grubuna göre % 32 oranında artış gösterirken, serum insulin düzeyi % 94 oranında artış göstermiştir (Çizelge 3.1). Açlık durumunda artmış kan insulin düzeyleri periferde gelişmiş olabilecek insulin direnci ya da artmış insulin salınımını düşündürmektedir. Oral glukoz tolerans testi uygulaması ile insulin direnç gelişimi incelenen sıçanlarda, glukoz yüklemesinin ardından (15.dk) kan glukoz düzeyi, kontrol ve MetS gruplarında yaklaşık aynı seviyeye yükselmesine karşın artmış glukozun uzaklaştırılma hızı ve oranı MetS grubunda daha düşük bulunmuştur (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Zamana bağlı oral glukoz tolerans testi sonuçları (A), bu verilerin normalize edilmiş hali (B), zaman aralıklarındaki yüzde değişimler (C). Çubuk grafik ortalama±SEM, * $P < 0,05$ ($n_{\text{Kontrol}} = 22$, $n_{\text{MetS}} = 33$).

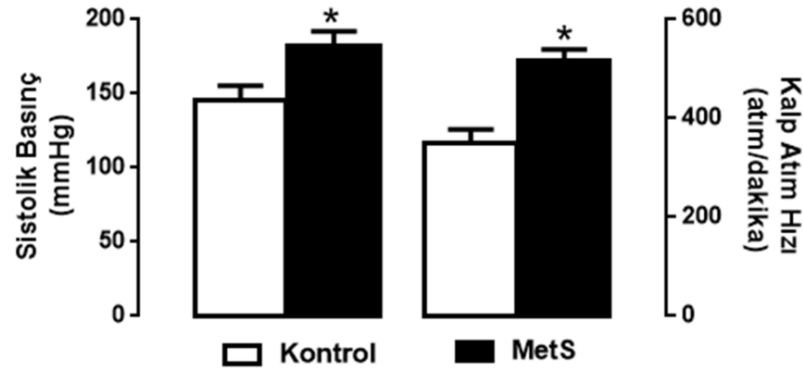
MetS grubunda kan glukoz uzaklaştırma hızının, glukoz yüklemesinden sonraki 15. - 30. dk, 30. - 60. dk, 60. - 120. dk zaman aralıklarında kontrole göre sırasıyla 1,7-, 1,3- ve 1,2-kat yavaşladığı bulunmuştur. Benzer şekilde, oral glukoz yüklemesinin ardından (15.dk) kan insulin düzeyi kontrol ve MetS gruplarında yaklaşık aynı seviyeye yükselmesine karşın, artmış insulin miktarının uzaklaştırılma hızı ve oranı MetS grubunda kontrole göre daha düşük bulunmuştur (Şekil 3.2). MetS’da serum insulin uzaklaştırılma hızının glukoz yüklemesinden sonraki 15. - 30. dk ve 30. - 60. dk zaman aralıklarında kontrole göre sırasıyla 3,1- ve 2,9-kat yavaşladığı bulunmuştur.



Şekil 3.2. Serum insulin seviyelerinin zamana bağlı değişim grafiği (A), bu verilerin normalize edilmiş hali (B), zaman aralıklarındaki yüzde değişimler (C). Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, *P<0,05 (n_{Kontrol} =10, n_{MetS} =10).

Deney hayvanlarında insulin direncinin geliştiğini göstermenin bir diğer yolu, HOMA (homeostasis model assesment) indeks hesabıdır. HOMA-IR periferde insuline karşı gelişen direnci gösterirken HOMA- β pankreas beta hücrelerinin insulin salma kapasitesini gösterir. Bu değerler kontrol ve MetS grupları için hesaplandığında, insulin direnci indeksinin MetS’da kontrole göre % 190 oranında daha yüksek olduğu buna karşın insulin salma kapasitesinin gruplar arasında farklı olmadığı bulunmuştur (Çizelge 3.1).

Hiperlipidemi, insulin direnci, artmış açlık kan glukoz değerlerine ek olarak sistolik kan basıncı artışı da MetS tanı kriterleri arasında sayılmaktadır. Uyguladığımız deney protokolü sonucunda sıçanlarda MetS geliştiğini doğrulamak amacıyla, sıçan kuyruklarından arter kan basınçları ölçülmüş ve Şekil 3.3’de görüldüğü gibi MetS durumunda sistolik kan basıncının kontrol grubu değerlerine göre % 25, kalp atım hızının ise % 47 oranında artmış olduğu bulunmuştur.

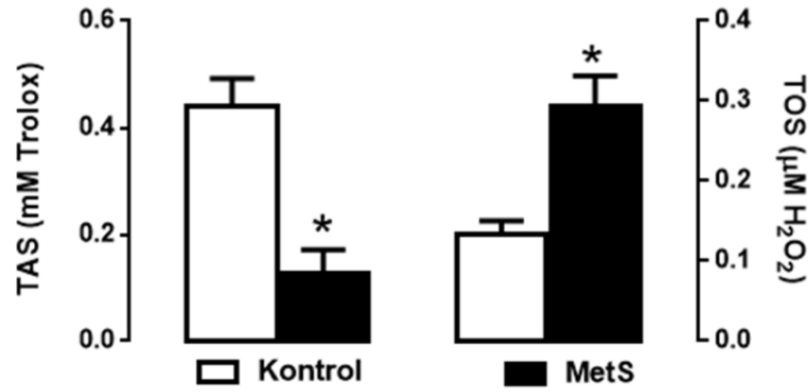


Şekil 3.3. Hemodinamik parametreler. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, *P<0,05 (n_{Kontrol} =6, n_{MetS} =6).

Metabolik sendrom oluşturmaya hedeflediğimiz sıçanlarda serum leptin ve ghrelin düzeyleri, metabolik sendromun sistemik parametreleri olarak değerlendirilerek Western-blot yöntemi ile protein düzeyleri ölçülmüş ve MetS’da ghrelin protein seviyesinin % 30 azalırken, leptin protein seviyesinin % 32 oranında arttığı gözlenmiştir. Bu veriler ışığında uyguladığımız yüksek sükröz içeren diyet ile 16-hafta boyunca besleme protokolünün sıçanlarda metabolik sendrom oluşturduğu doğrulanmıştır.

3.1.3. Metabolik Sendrom Gelişmiş Sıçanlarda Sistemik Oksidatif Stresin Artışı

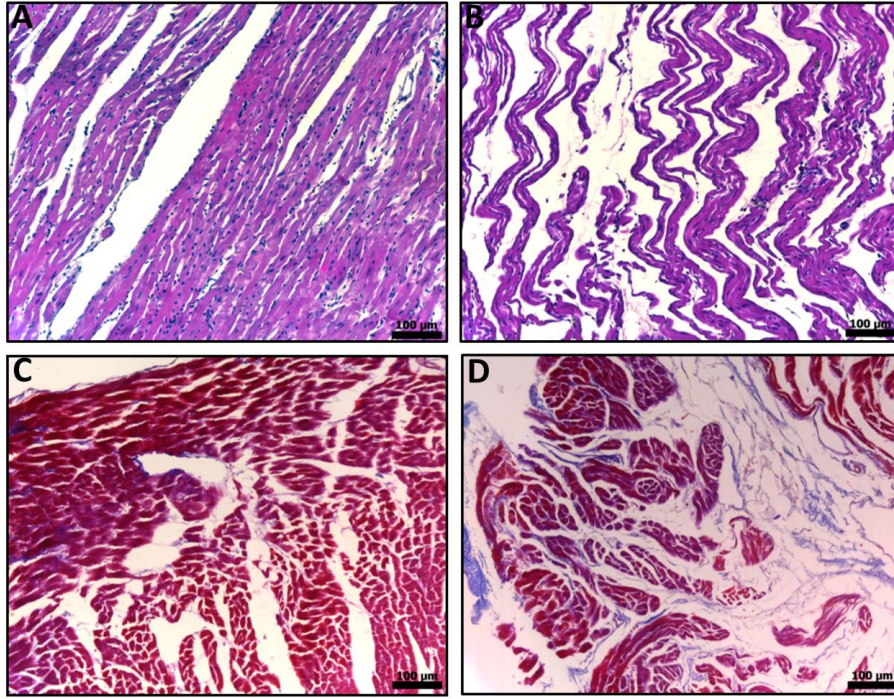
Uyguladığımız deney protokolünün metabolik sendrom oluşturma potansiyelini ve oluşan sendromda hangi parametrelerin hastalık patofizyolojisine katkıda bulunduğunu anlamayı amaçladığımız bu çalışmada, sıçanların serum oksidasyon durumlarının ölçülmesinin çalışmalarımıza yol göstereceği düşüncesi ile serum örneklerinde “total antioksidan durum (TAS)” ve “total oksidan durum (TOS)” ölçülmüştür. Şekil 3.4’de görüldüğü gibi TAS, MetS grubunda kontrole göre % 71 azalırken, TOS % 123 oranında artış göstermiştir. Bu veriler ışığında MetS durumunda sistemik oksidatif stresin olduğu gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Serum oksidan ve antioksidan seviyelerinin spektrofotometrik olarak belirlenmesi. Çubuk grafik ortalama±SEM, *P<0,05 (n_{Kontrol}=20, n_{MetS}=20).

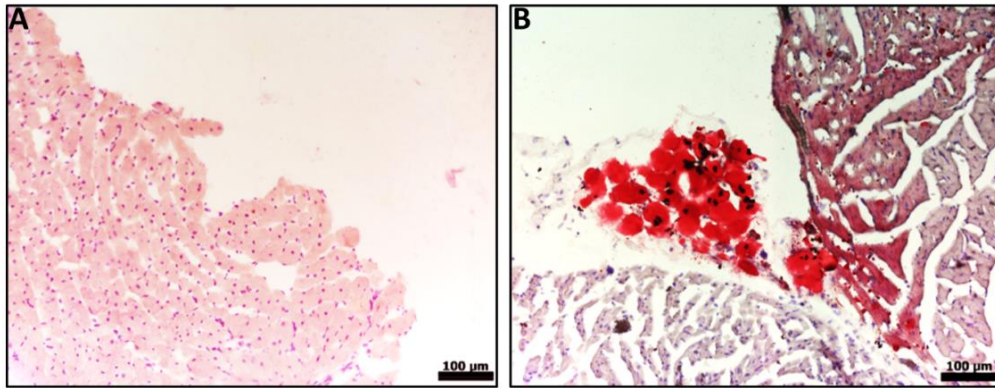
3.1.4. Kalp Dokularında Histolojik İncelemeler

Yüksek sükröz içeren diyet ile beslenmiş sıçanların kalp dokularındaki yapısal değişimlerin incelenmesi amacıyla doku kesitleri Hematoksilen Eozin (HE)(Şekil 3.5A-B), Masson'un Trikrom boyası (MT) (Şekil 3.5C-D) veya Oil Red-O boyası (Şekil 3.6) ile boyanmıştır. HE ile boyanan MetS grubuna ait doku kesitleri (Şekil 3.5B) kontrol grubuna ait kesitler ile karşılaştırıldığında (Şekil 3.5A) miyofibrillerin düzenli yapısını kaybettiği, ondülasyon görünümünün olduğu ve miyofibril kayıplarının olduğu görülmektedir. MT ile boyanan MetS grubuna ait doku kesitleri (Şekil 3.5D), kontrol grubuna ait kesitler ile karşılaştırıldığında ise (Şekil 3.5C) MetS durumunda miyokardiyumda bağ doku artışı ve miyofibril kaybı olduğu görülmektedir.



Şekil 3.5. Kalp dokusunun ışık mikroskop incelemesi ($n_{\text{Kontrol}}=9$, $n_{\text{MetS}}=9$).

Şekil 3.6’da MetS (Şekil 3.6B) durumunda miyokardiyal lipid birikiminin kontrol grubuna (Şekil 3.6A) göre artmış olduğu görülmektedir. Lipid birikimine ait skorlama Şekil 3.6C’de verilmiştir buna göre kontrol grubunda 9 kalp dokusunda 1 skor değeri, MetS grubunda 9 kalp dokusunda 20 skor değeri elde edilmiştir.



C

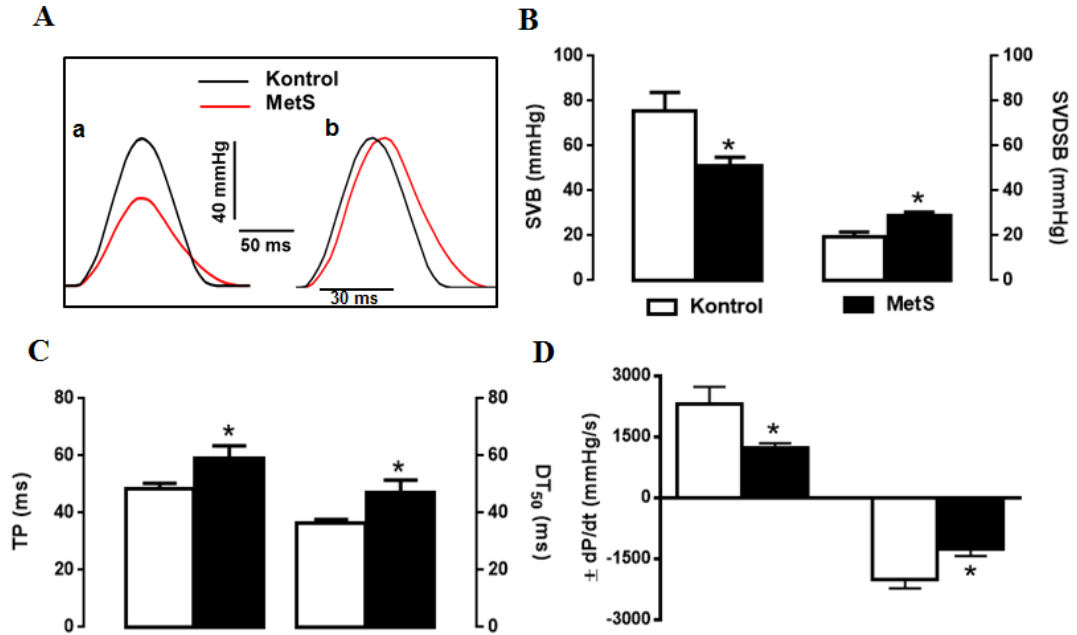
	Lipid birikimi skorları								
Kontrol n=9	0	0	0	1	0	0	0	0	0
MetS n=9	1	2	3	2	4	4	0	0	4

Şekil 3.6. Oil-Red O ile boyanmış doku kesitlerinde intrasitoplazmik lipid birikiminin ışık mikroskobu ile incelenmesi.

3.2. Metabolik Sendrom Gelişmiş Sıçanlarda Kalbin Mekanik Fonksiyonu

3.2.1. İzovolumetrik Sol Ventrikül İçi Basınç Değerleri

Langendorff perfüzyon sistemine yerleştirilen kalplerin örnek izovolumetrik sol ventrikül içi basınç değişimleri Şekil 3.7A’da verilmiştir.



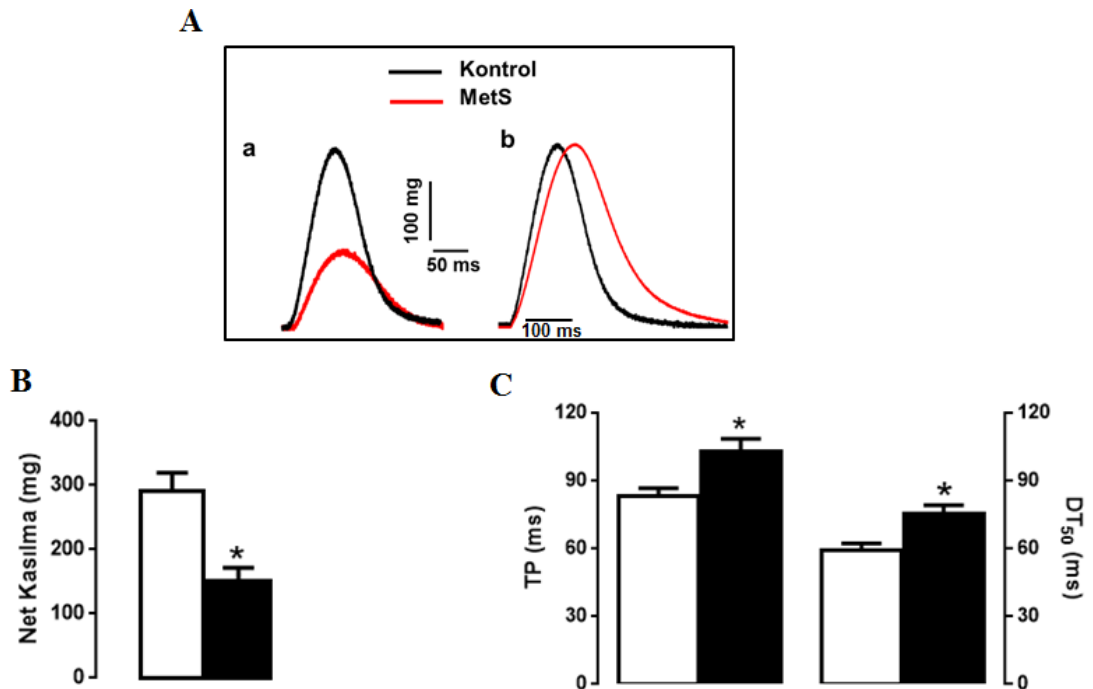
Şekil 3.7. İzovolumetrik sol ventrikül içi basınç değişimlerinin *in situ* olarak incelenmesi. Çubuk grafik ortalama±SEM, *P<0,05 (n_{Kontrol} =13, n_{MetS}=16).

Sol ventrikül içi diyastol sonu basınç değişimleri (SVDSB)(Şekil 3.7B, sağ taraf) kontrol (20±2 mmHg) ve MetS grubunda (29±1,4 mmHg) karşılaştırıldığında MetS’da % 47 artış bulunmuştur. Elektriksel uyarı ile indüklenen sol ventrikül içi basınç değişimi (SVB)(Şekil 3.7B, sol taraf) kontrol (76±8 mmHg) ve MetS grubunda (51±4 mmHg) karşılaştırıldığında ise MetS grubunda kasılma kuvvetinin % 32 daha düşük olduğu bulunmuştur. Sarsı eğrilerinin zaman desenleri incelendiğinde, tepeye ulaşma süresi (TP; Şekil 3.7C, sol taraf) MetS (59±4 ms) grubunda kontrole (48±2 ms) göre % 23 ve tepe değerinin yarısına iniş süresi (DT₅₀; Şekil 3.7C, sağ taraf) MetS’da (47±4 ms) kontrole (37±1 ms) göre % 29 uzamıştır. Gruplar arasında sol ventrikül içi basıncın artma ve azalma hızları karşılaştırıldığında MetS grubunda (1240±100 mmHg; 1275±157 mmHg) kontrol

grubuna (2312 ± 416 mmHg; -2001 ± 224 mmHg) göre basınç artışının % 46, basınç azalışının ise % 36 oranında yavaşladığı bulunmuştur (Şekil 3.7D).

3.2.2. Papiller Kas İzometrik Kasılma Değerleri

Sol ventrikülden izole edilen papiller kasın, izometrik koşullarda kasılmaları kontrol ve MetS gruplarında incelenmiş ve bulgular Şekil 3.8’de sunulmuştur. Gruplara ait örnek sarsı eğrileri Şekil 3.8A’da verilmiştir.



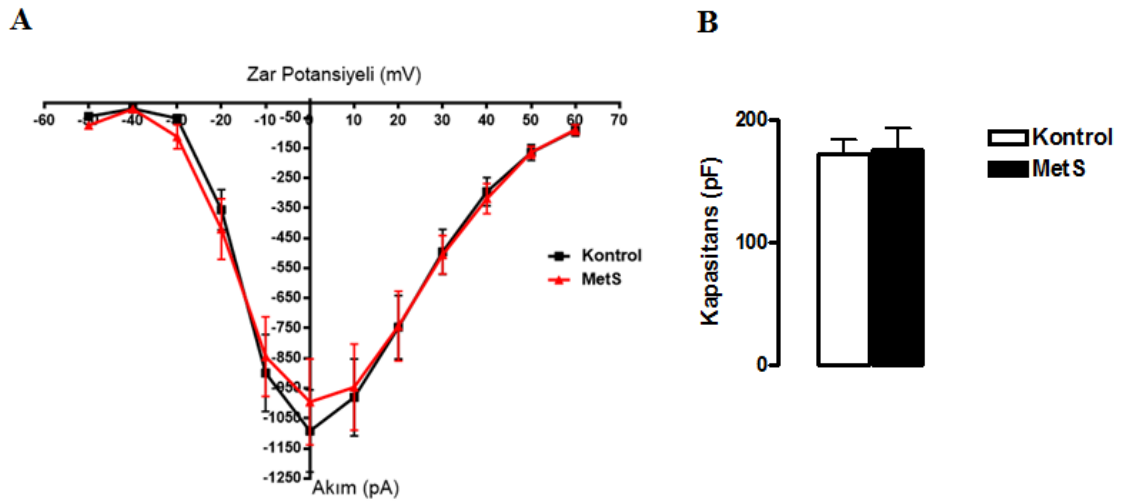
Şekil 3.8. Elektriksel alan uyarısı ile elde edilen papiller kas kasılma-gevşeme değerleri. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, * $P < 0,05$ ($n_{\text{Kontrol}} = 11$, $n_{\text{MetS}} = 14$).

Elektriksel olarak uyarılan papiller kas şeritlerinde kaydedilen net kasılma verileri incelendiğinde MetS grubunda kasılma kuvvetinin (152 ± 20 mg), kontrol grubuna (291 ± 29 mg) göre % 139 azaldığı bulunmuştur (Şekil 3.8B). Sarsı eğrilerinin zaman deseni incelendiğinde, tepeye ulaşma süresi (TP; Şekil 3.8C, sol taraf) MetS’da (103 ± 6 ms) kontrole (83 ± 3 ms) göre % 24 uzarken, sarsı eğrisinin tepe noktasından yarısına ulaşma süresi MetS’da (76 ± 4 ms) kontrol grubuna ($59,3 \pm 2,9$ ms) göre % 27 uzamıştır.

3.3. Metabolik Sendrom Gelişmiş Sıçan Kardiyomiyositlerinde Hücre İçi Ca^{2+} Homeostazı

3.3.1. L-tipi Ca^{2+} Kanal Akımları

Metabolik sendromun, sol ventrikül kardiyomiyositlerinde hücre içi Ca^{2+} homeostazı üzerine etkilerini incelemek için, öncelikle hücre içine L-tipi Ca^{2+} kanalları (LTKK) aracılığıyla Ca^{2+} girişi incelenmiştir. Şekil 3.9A'da voltaj kenetleme tekniği ile ölçülen LTKK akım-voltaj (I-V) karakteristiği görülmektedir.



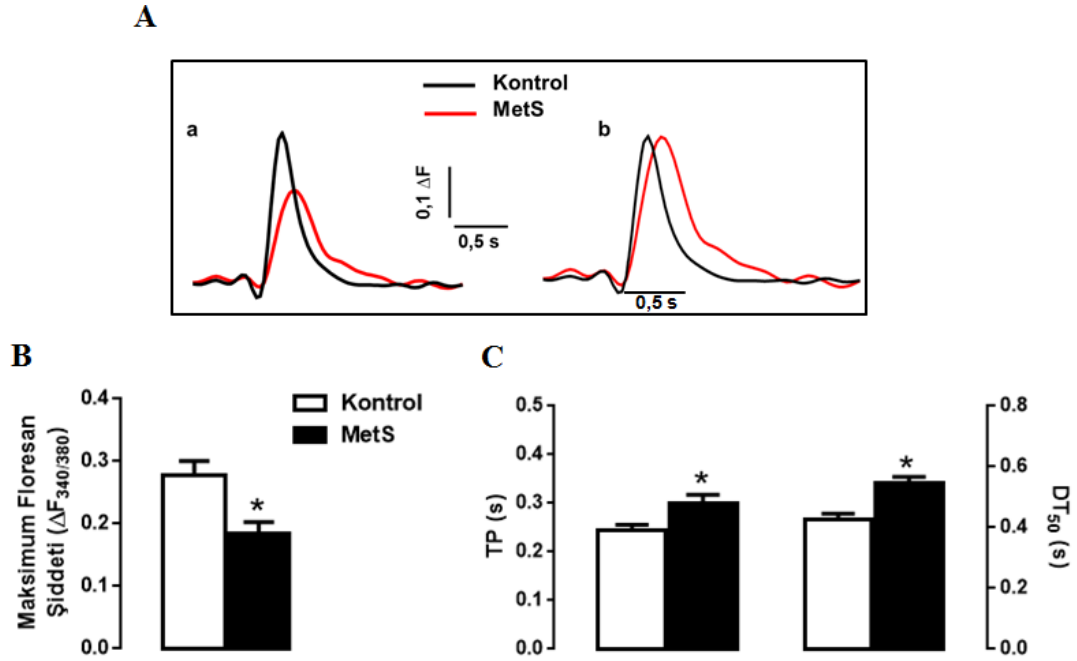
Şekil 3.9. L-tipi Ca^{2+} kanal akımlarının akım-voltaj karakteristiği. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, ($n_{\text{Kontrol}}=4$, $n_{\text{MetS}}=6$).

Bu veriler incelendiğinde LTKK akımlarının ve hücre zar sığasının kontrol ve MetS grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($P>0,05$) farklı olmadığı bulunmuştur.

3.3.2. Metabolik Sendrom Gelişmiş Sıçan Kardiyomiyositlerinde Hücre İçi Global Ca^{2+} Değişimleri (Transientleri)

Kalp kasında kasılma-gevşeme süreci hücre içi Ca^{2+} seviyesindeki değişimlerle gerçekleşmektedir. Elektriksel uyarı altında, LTKK'larının açılması hücre içine Ca^{2+} girişine yol açar ve hücre içinde artan serbest Ca^{2+} seviyesi, Ca^{2+} deposunu (SR) uyarak Ca^{2+} uyarımlı- Ca^{2+} salınımını tetikler ve diğer değişimlerle birlikte kasılma

olayı başlar (uyarılma-kasılma çiftlenimi). MetS’da gözlediğimiz kalp kasılma-gevşeme fonksiyon bozukluğunda hücre içi Ca^{2+} ’un rolünü araştırmak amacıyla, izole kardiyomiyositlerde elektiriksel uyarım ile oluşan hücre içi global geçici Ca^{2+} değişimleri (transientler) incelenmiştir. Şekil 3.10A’da kontrol ve MetS gruplarından kaydedilen örnek Ca^{2+} transientleri ile ilişkili floresans değişimleri görülmektedir.

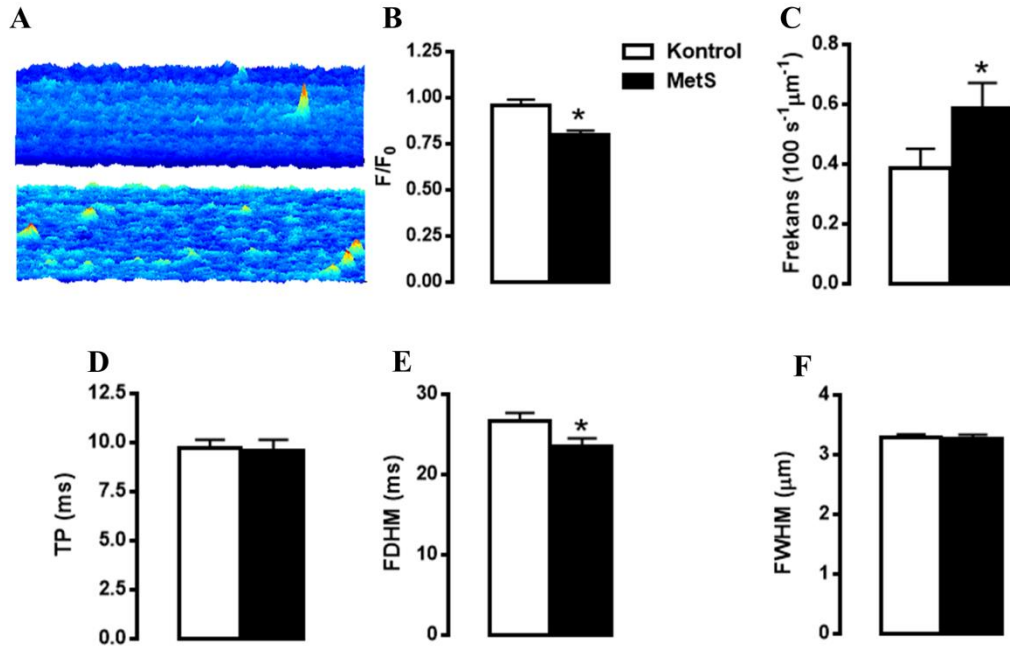


Şekil 3.10. İzole kardiyomiyositlerde hücre içi Ca^{2+} transientleri. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, ($n_{\text{Kontrol}}=24$, $n_{\text{MetS}}=28$).

Ca^{2+} transientlerinin genlikleri gruplar arasında karşılaştırıldığında MetS’da ($0,28\pm0,02$ au) kaydedilen genlikler kontrol grubuna ($0,18\pm0,02$ au) göre % 36 azalmıştır (Şekil 3.10B). Ca^{2+} transientlerinin zaman desenleri incelendiğinde ise sinyalin tepe noktasına ulaşma süresi (TP; Şekil 3.10C, sol taraf) MetS grubunda ($0,3\pm0,02$ s) kontrole ($0,24\pm0,01$ s) göre % 25 uzarken, sinyalin tepe noktasından yarı değerine düşme süresi (DT_{50} ; Şekil 3.10C, sağ taraf) MetS grubunda ($0,54\pm0,02$ s) kontrole ($0,42\pm0,02$ s) göre % 29 oranında uzama göstermiştir.

3.3.2. Metabolik Sendromlu Sıçan Kardiyomiyositlerinde Lokal Ca^{2+} Salınım (Spark) Parametreleri

Ryanodin reseptör fonksiyonu hakkında bilgi veren Ca^{2+} spark bulguları Şekil 3.11’de verilmiştir. MetS’lu kardiyomiyositlerde ölçülen spark sinyal şiddeti kontrole göre % 16 azalırken (Şekil 3.11B), frekansı % 51 oranında artmıştır (Şekil 3.11C). Sinyalin tepeye çıkış süresi (TP) ve sinyal genişliğinin yarıya inme süresi (FWHM) gruplar arasında farklılık göstermezken, sinyalin tepe değerinden yarıya inme süresi MetS’lu grupta kontrole göre %12 oranında azalmıştır.

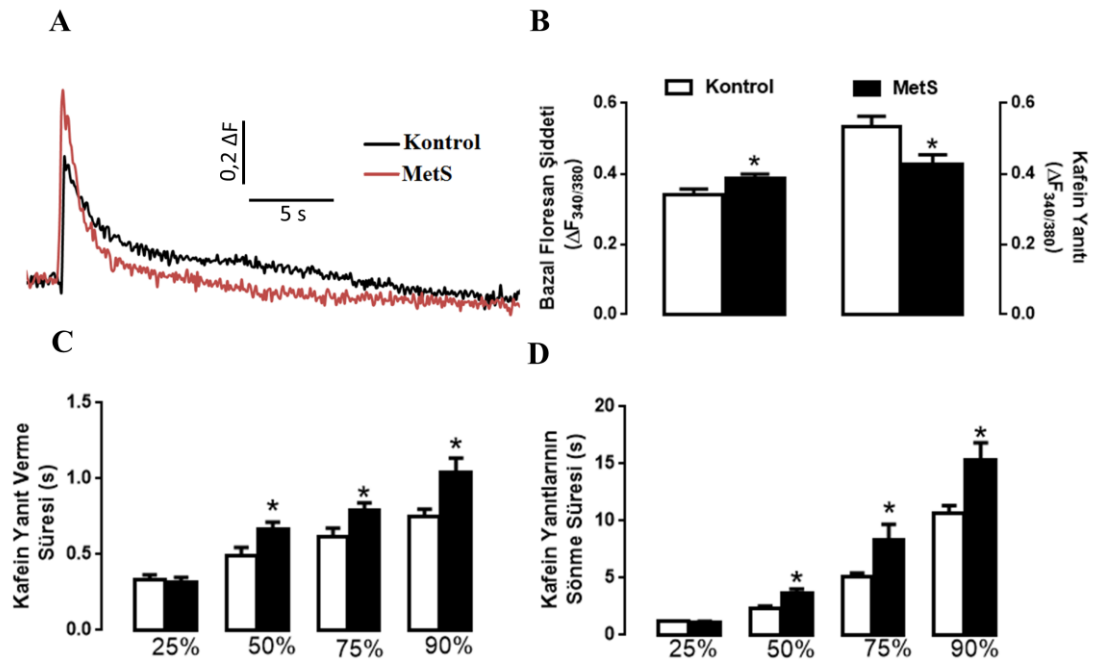


Şekil 3.11. Metabolik sendromlu sıçan kardiyomiyositlerinde Ca^{2+} sparklarının uzaysal ve zamansal özellikleri. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, ($n_{\text{Kontrol}} = 71$, $n_{\text{MetS}} = 101$).

Ca^{2+} spark parametrelerinde gözlenen bu değişimler, MetS deney modelinin RyR2 fonksiyonları üzerine etkisinin olduğunu ve MetS-indüklü kalp fonksiyonlarının altında yatan mekanizmaları değerlendirirken RyR2’lerinin dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

3.3.3. Metabolik Sendromlu Sıçan Kardiyomiyositlerinde Sarkoplazmik Retikulum (SR) Ca^{2+} Salma ve Geri Alma Fonksiyonları

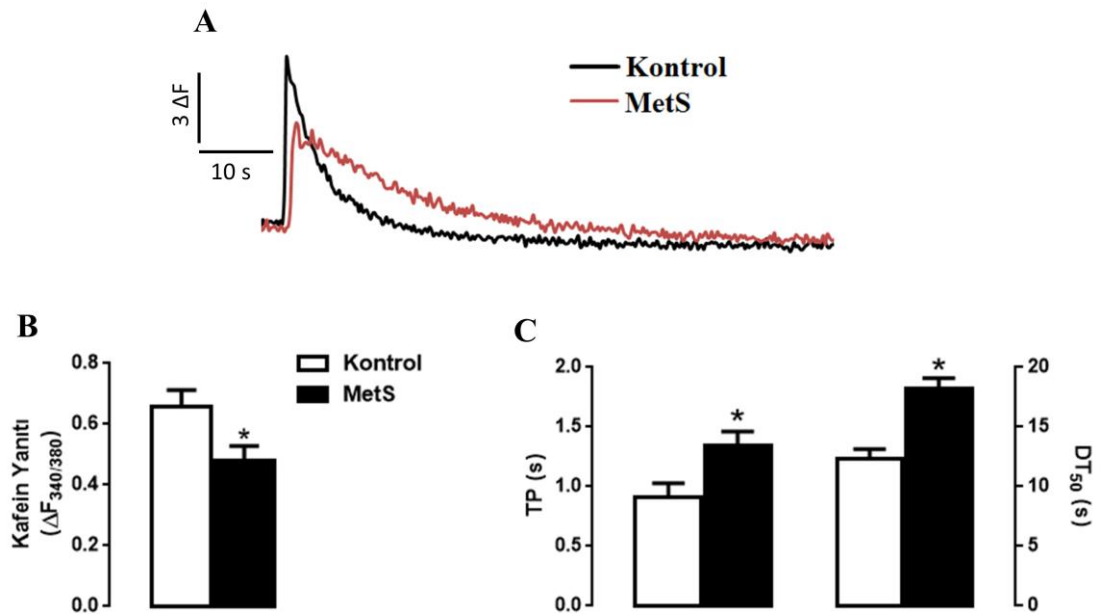
Kardiyomiyositlerde Ca^{2+} deposu olarak bilinen sarkoplazmik retikulum (SR) kasılma-gevşeme çiftleniminin regülasyonunda çok önemli rol üstlenmiştir. Metabolik sendrom durumunda gözlenen kasılma fonksiyon bozukluğu ve değişmiş Ca^{2+} transient parametrelerinin altında yatan nedenin SR'nın Ca^{2+} salma-geri alma fonksiyon bozukluğundan kaynaklı olabileceği düşünülerek, izole edilmiş kardiyomiyositlerde kafein yanıtları incelenmiştir. Bu hücrelerde 10 mM kafein uygulamasının SR'dan Ca^{2+} salınımından sorumlu olan ryanodin reseptörlerini (RyR2) uyararak depo içindeki serbest Ca^{2+} 'un sitoplazmaya salınmasına neden olduğu ve bu sayede SR Ca^{2+} miktarının tespit edilebildiği önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Pieske ve ark., 1999). Bu bilgi referans alınarak yapılan ölçümlerde, Şekil 3.12A'da kontrol ve MetS gruplarında kaydedilen 10 mM kafein yanıtlarının örnek eğrileri görülmektedir.



Şekil 3.12. Kardiyomiyositlerde gruplar arası kafein yanıtlarının karşılaştırılması. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, (3-5 farklı hayvandan $n_{\text{Kontrol}}=16$, $n_{\text{MetS}}=14$).

Fura-2 floresan boyası ile boyanan izole kardiyomiyositlerde bazal floresan miktarı, Fura-2 boyasının oransal ölçüm yapabilen (ratiometrik) bir boya olması nedeniyle

hücrelerdeki bazal Ca^{2+} miktarı hakkında bilgi vermektedir (Şekil 3.12B, sol taraf). MetS’da bazal Ca^{2+} miktarı ($0,39 \pm 0,01$ au) kontrole ($0,34 \pm 0,01$ au) göre % 15 artmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0,05$). Kafein yanıtları incelendiğinde ise MetS durumunda ($0,43 \pm 0,03$ au) gözlenen floresan şiddetinin kontrol grubuna ($0,53 \pm 0,03$ au) göre %19 azaldığı bulunmuştur (Şekil 3.12B, sağ taraf). Kafein yanıtlarının zaman desenleri incelendiğinde, kafein yanıtının oluşması için geçen süre MetS’da kontrole göre anlamlı düzeyde uzundur, kafein yanıtının % 90’ının oluşma süresi MetS’da ($1,05 \pm 0,09$ s) kontrole göre ($0,75 \pm 0,05$ s) % 40 uzamıştır (Şekil 3.12C, sol taraf). Kafein yanıtının sönümlenme fazı da MetS’da daha uzun sürmektedir (Şekil 3.12C, sağ taraf). MetS’da kafein yanıtının % 90’ının sönümlenme süresi ($15,28 \pm 1,6$ s) kontrol grubuna ($10,71 \pm 0,63$ s) göre % 43 uzamıştır.

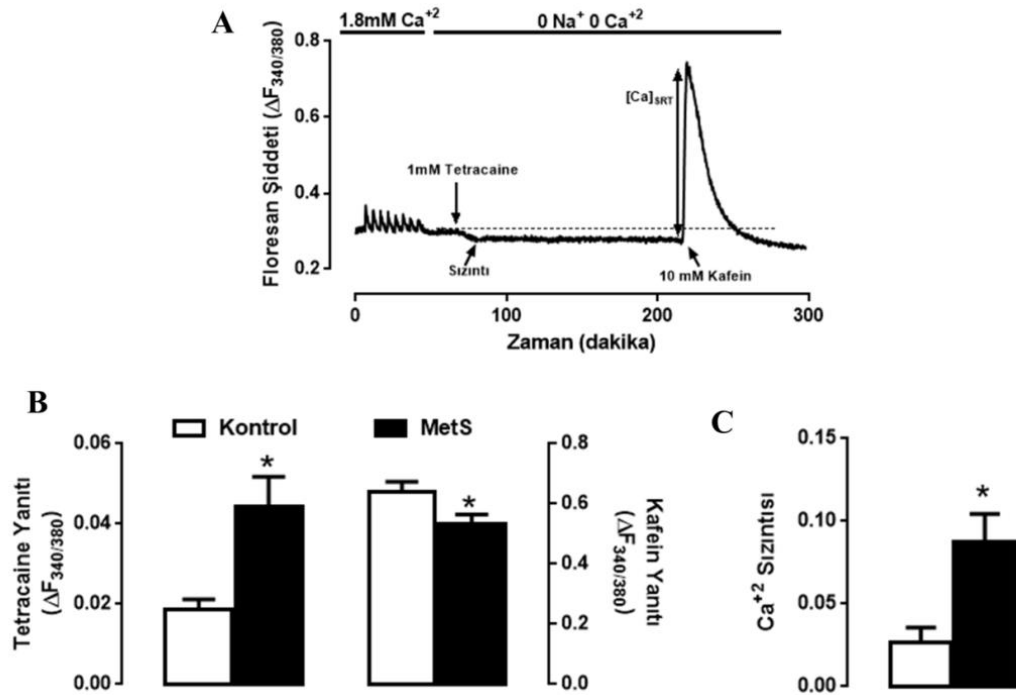


Şekil 3.13. Sarkoplazmik retikulum Ca^{2+} -pompa (SERCA) aktivitesinin ölçülmesi. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, ($n_{\text{Kontrol}}=12$, $n_{\text{MetS}}=11$).

SR Ca^{2+} miktarı, sarkoendoplazmik retikulum kalsiyum ATPaz (SERCA) ve RyR2 aktivitelerinin bir fonksiyonudur. MetS durumunda azalmış kafein yanıtının nedeni; SERCA’nın hücre içi Ca^{2+} ’u SR içine etkili biçimde pompalayamaması olarak düşünülerek SERCA aktivitesi gruplar arasında karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Şekil 3.13A'da $0 \text{ Na}^+ - 0 \text{ Ca}^{2+}$ ortamında kaydedilen 10 mM kafein yanıtlarının temsili eğrileri verilmiştir. $0 \text{ Na}^+ - 0 \text{ Ca}^{2+}$ içeren ortamda NCX bloke olduğu için kafein uyarımı ile artan sitoplazmik Ca^{2+} büyük oranda SERCA tarafından SR'a geri pompalanarak sitoplazmadan elimine edilir bu nedenle kafein yanıtlarının sönümlenme süreleri arasındaki fark SERCA aktivitesi olarak yorumlanmıştır. Şekil 3.13B'de görüldüğü gibi MetS'da ($0,48 \pm 0,05 \text{ s}$) kontrole ($0,66 \pm 0,05 \text{ s}$) göre kafein yanıt şiddetinde % 27 azalma bulunmuştur. Kafein yanıtının zaman deseni incelendiğinde MetS'da yanıtın tepe noktasına çıkma süresi (TP) ($1,34 \pm 0,12 \text{ s}$) kontrole ($0,91 \pm 0,12 \text{ s}$) göre % 47 uzarken (Şekil 3.13C, sol taraf), yanıtın tepe noktasından yarı değerine düşme süresi (DT_{50}) MetS grubunda ($11,12 \pm 0,86 \text{ s}$) kontrole ($6,59 \pm 0,43 \text{ s}$) göre % 69 uzamıştır (Şekil 3.13C, sağ taraf).

Ryanodin reseptörleri SR'dan Ca^{2+} salarak kasılmayı başlatması bakımından kasılma fonksiyonunun regülasyonunda oldukça önemli bir yere sahiptir. Yapılan çalışmalarda hiperfosforile, okside ya da aksesuar proteinleri ile interaksyonu bozulmuş olan RyR2'lerinin kardiyak patofizyoloji gelişimine büyük katkı sağladığı ve bu reseptörü hedef alan tedavi yaklaşımlarının başarılı sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Elliott ve ark., 2011). RyR2'leri hiperfosforile oldukları durumda sızıntılı konuma geçerler ve Ca^{2+} salma koordinasyonu göreceli olarak ortadan kalkar (Marx ve ark., 2000; Wehrens ve ark., 2006). MetS'da ölçülen artmış bazal Ca^{2+} düzeyleri ve azalan SR Ca^{2+} miktarı bu deney modelinde RyR2'lerinin bozulmuş kasılma fonksiyonlarına katkıda bulunabileceğini düşündürmüş ve izole kardiyomiyositlerde RyR2 sızıntı oranları tetracaine uygulaması ile incelemiştir.



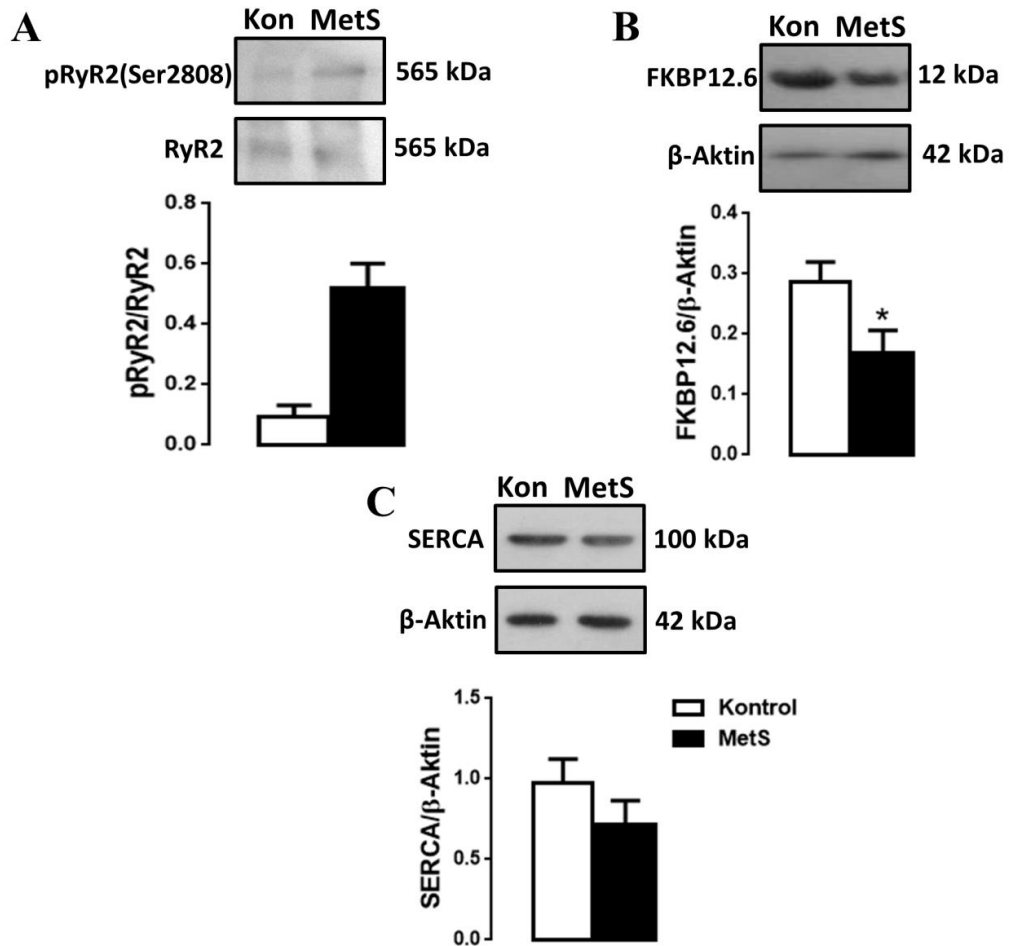
Şekil 3.14. Kontrol ve Metabolik sendrom (MetS) durumunda Ca²⁺ sızıntı miktarının belirlenmesi Çubuk grafik ortalama±SEM, (n_{Kontrol}=8, n_{MetS}=11).

Şekil 3.14A'da 0 Na⁺-0 Ca²⁺ ortamında 1 mM tetracaine uygulaması ile RyR2 Ca²⁺ sızıntı miktarı, bazal Ca²⁺ floresan şiddetindeki azalış olarak gözlenmektedir. MetS grubunda gözlenen tetracaine yanıtı (0,044±0,007) kontrole göre (0,018±0,003) % 144 daha fazla (Şekil 3.14B, sol taraf), kafein yanıtının ise kontrole göre % 17 oranında düşük olduğu görülmektedir (Şekil 3.14B, sağ taraf). Ölçülen tetracaine yanıtının kafein yanıtına oranlanması ile elde edilen Ca²⁺ sızıntı miktarları Şekil 3.14C'de verilmiştir. Buna göre MetS'da Ca²⁺ sızıntı miktarı (0,087±0,02) kontrole (0,026±0,004) göre % 235 yüksek bulunmuştur.

3.4. Western-blot Bulguları

3.4.1. Metabolik Sendromlu Sıçan Kalp Dokusunda Sarkoplazmik Retikulum Ca^{2+} -Salınım ve Ca^{2+} -Geri Alınımında Rol Alan Protein Miktarları

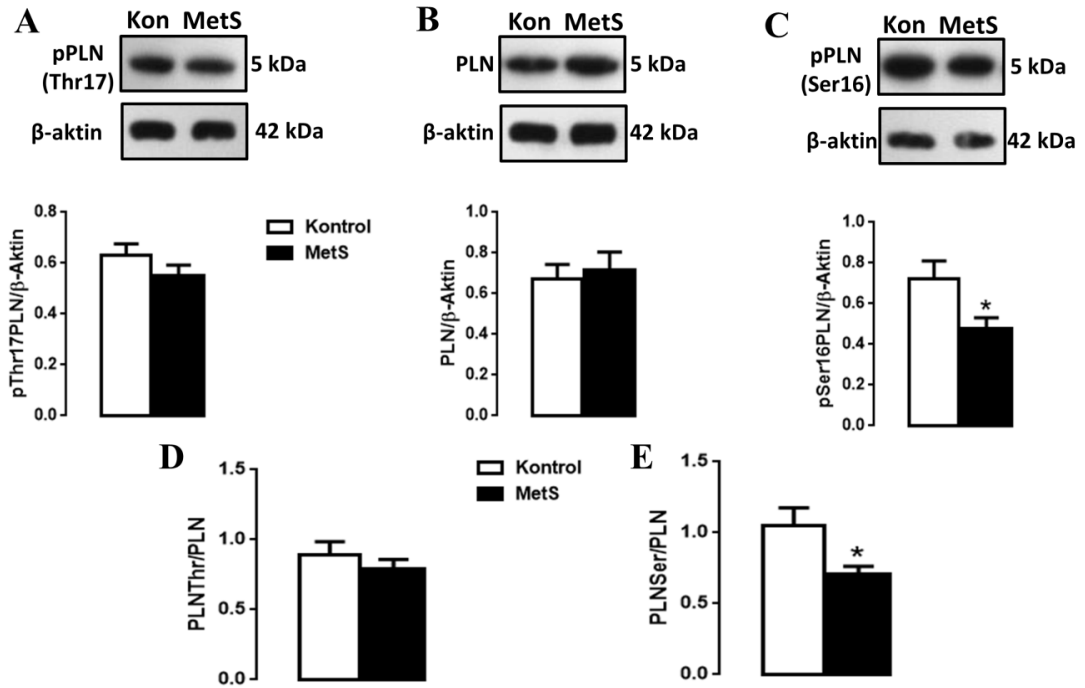
Yapılan çalışmalarda RyR2'lerinin hiperfosforile olması ile sızıntılı duruma geçtiği rapor edilmiştir (Wehrens ve ark., 2006). MetS durumunda bazal Ca^{2+} floresan ve Ca^{2+} -sızıntı artışı bu deney modelinde RyR2'lerinin hiperfosforile durumda olabileceğini düşündürmektedir. Homojenize kalplerde RyR2'lerinin fosforilasyon düzeyleri incelendiğinde MetS durumunda bu değerin kontrole göre yaklaşık 6-kat arttığı görülmüştür (Şekil 3.15A).



Şekil 3.15. Metabolik sendromlu (MetS) sıçanlarda Ca^{2+} salınımı ile ilgili proteinlerin biyokimyasal analizi. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, (n_{Kontrol} =6, n_{MetS} =6).

RyR2'lerinin fonksiyonu aksesuar proteinleri tarafından regüle edilmektedir. FK506 bağlayan protein (FKBP12.6) RyR2'lerinin stabilizasyonunu sağlamaktadır. Kardiyak aritmi ve fonksiyon bozukluklarında bu aksesuar proteinin önemli ölçüde azaldığı ve RyR2'lerinin stabilitesinin bozulduğu gösterilmiştir (Yano ve ark., 2003). Kaynak verileri ile uyumlu olarak MetS grubunda ölçülen FKBP12.6 protein seviyesinin kontrole göre 2-kat azaldığı bulunmuştur (Şekil 3.15B).

Uyarılma-kasılma çiftleniminde salınan Ca^{2+} 'un depo içerisine geri alınması SERCA tarafından gerçekleştirilir. SERCA'nın pompa fonksiyonu, hücreye herhangi bir uyarı olmadığı bazal durumda, fosfolamban (PLN) proteini tarafından inhibe durumdadır. Artmış beta adrenerjik uyarım altında PLN'in protein kinaz A (PKA) tarafından fosforile olması ile PLN'in SERCA üzerindeki inhibisyonu kalkar. Şekil 3.13'de görüldüğü gibi SERCA aktivitesi MetS durumunda azalmaktadır. Bu etkinin altında yatan neden araştırılmak üzere öncelikle SERCA protein seviyesi homojenize kalp dokularında ölçülmüş ve MetS grubunda bu değerin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişime uğramadığı görülmüştür (Şekil 3.15C).

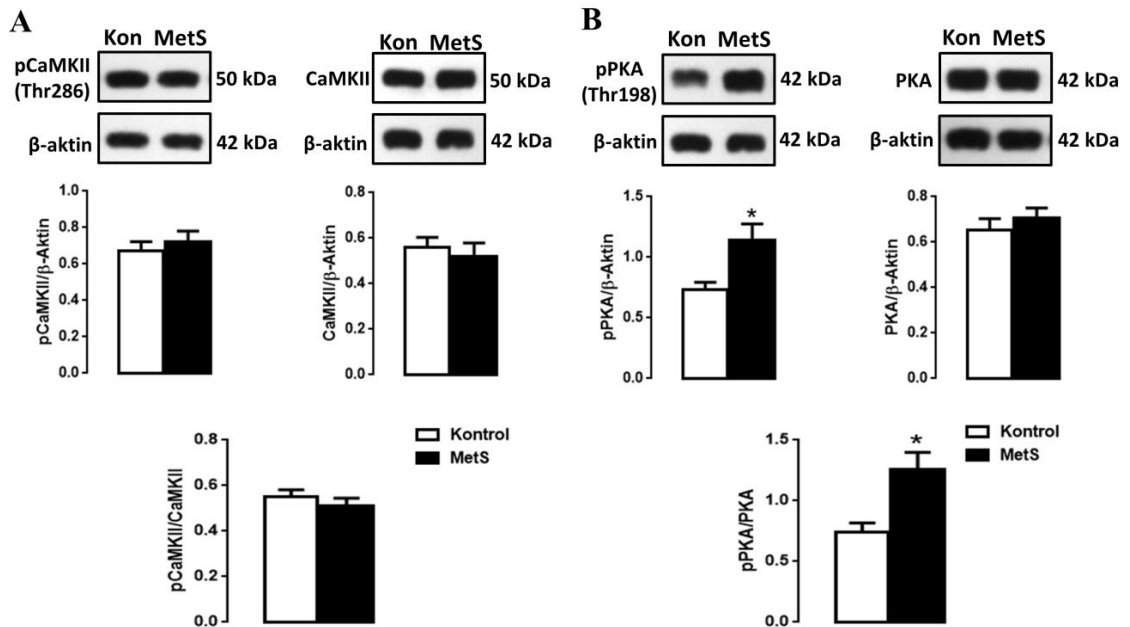


Şekil 3.16. Kalp homojenatlarında farklı amino asit bölgelerinden fosforillenen fosfolamban (PLN) seviyeleri. Çubuk grafik ortalama±SEM, ($n_{\text{Kontrol}}=6$, $n_{\text{MetS}}=6$).

SERCA fonksiyonunu regüle eden PLN fosforilasyon ve protein miktarı incelendiğinde ise (Şekil 3.16), PLN'in toplam protein miktarının ve Ca-kalmodulin kinaz II (CaMKII) tarafından 17. threonine aminoasitinden fosforilasyonunun kontrol ve MetS grupları arasında farklı olmadığı (Şekil 3.16A-B-D) buna karşın PKA tarafından 16. serine aminoasitinden fosforile olan formunun protein miktarının (Şekil 3.16C) ve fosforilasyon düzeyinin (Şekil 3.16E) MetS grubunda kontrole göre 1,5-kat azaldığı gözlenmiştir.

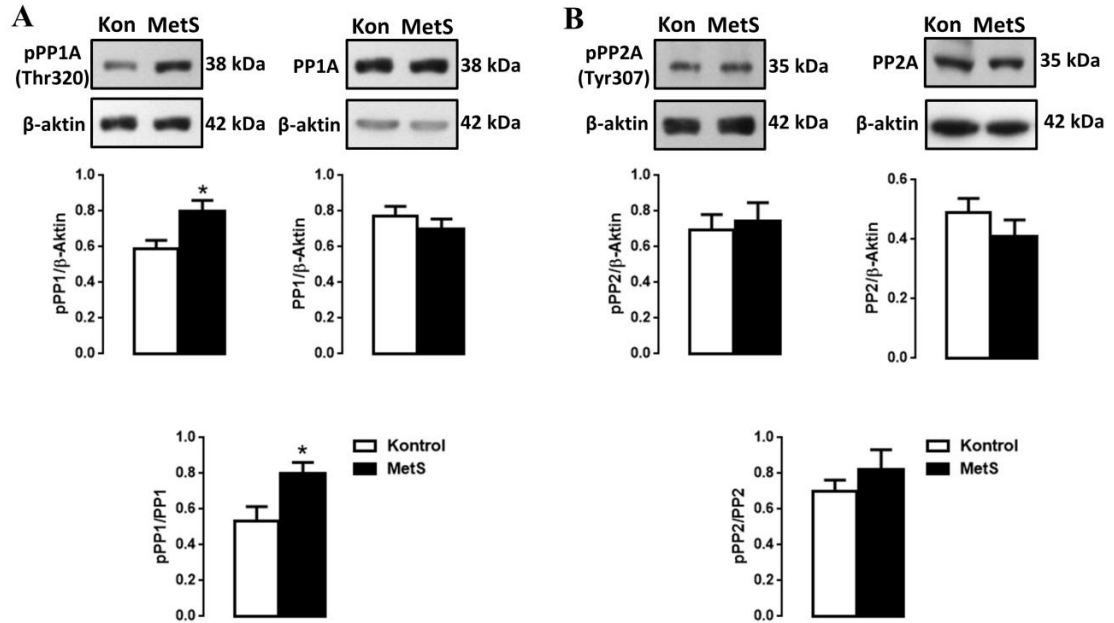
3.4.2. Metabolik Sendromlu Sıçan Kalp Dokusunda Ryanodin Reseptör (RyR2) Fosforilasyonunda Rol Alan Kinaz ve Fosfatazlar

Kardiyak ryanodin reseptörlerinin (RyR2) PKA ve CaMKII tarafından fosforile olduğu bilinmektedir. Şekil 3.15A'da görüldüğü gibi MetS durumunda RyR2 fosforilasyonu artmaktadır. Bu artış MetS durumunda PKA ve/veya CaMKII aktivasyonunun artmış olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 3.17. Metabolik sendromlu (MetS) sıçan kalbinde RyR2 fosforilasyonundan sorumlu PKA ve CaMKII'nin fosforilasyon düzeyleri. Çubuk grafik ortalama±SEM, ($n_{\text{Kontrol}}=6$, $n_{\text{MetS}}=6$).

Şekil 3.17’de kontrol ve MetS gruplarına ait homojenize kalp dokularında CaMKII (Şekil 3.17A) ve PKA (Şekil 3.17B) protein ve fosforilasyon düzeyleri verilmiştir. Buna göre MetS’da PKA fosforilasyon miktarı kontrole göre 2-kat (Şekil 3.17B, alt taraf), fosforile protein miktarı (Şekil 3.17B, sol taraf) ise 1,5-kat artarken, CaMKII protein miktarı ya da fosforilasyon düzeyi gruplar arasında farklılık göstermemiştir. Bu veriler ışığında MetS durumunda artmış PLN ve RyR2 fosforilasyon oranlarından hiperaktif PKA’nın sorumlu olduğu düşünülebilir. Hücre içinde artmış fosforilasyon düzeyleri kinaz aktivasyonu ya da fosfataz inhibisyonu ile açıklanabilir. Protein fosfataz 1A’nın (PP1A) 320. threonine aminoasitinden, protein fosfataz 2A’nın ise 307. tirozin aminoasitinden fosforillendiğinde inhibe olduğu bilinmektedir. MetS durumunda bu fosfatazlarının protein ve fosforilasyon düzeyleri incelendiğinde, PP1A’nın protein ve fosforilasyon düzeylerinin kontrol grubuna göre sırasıyla 1,4- ve 1,5-kat arttığı görülürken (Şekil 3.18A), PP2A’nın protein ve fosforilasyon düzeylerinin gruplar arasında fark göstermediği görülmüştür (Şekil 3.18B).

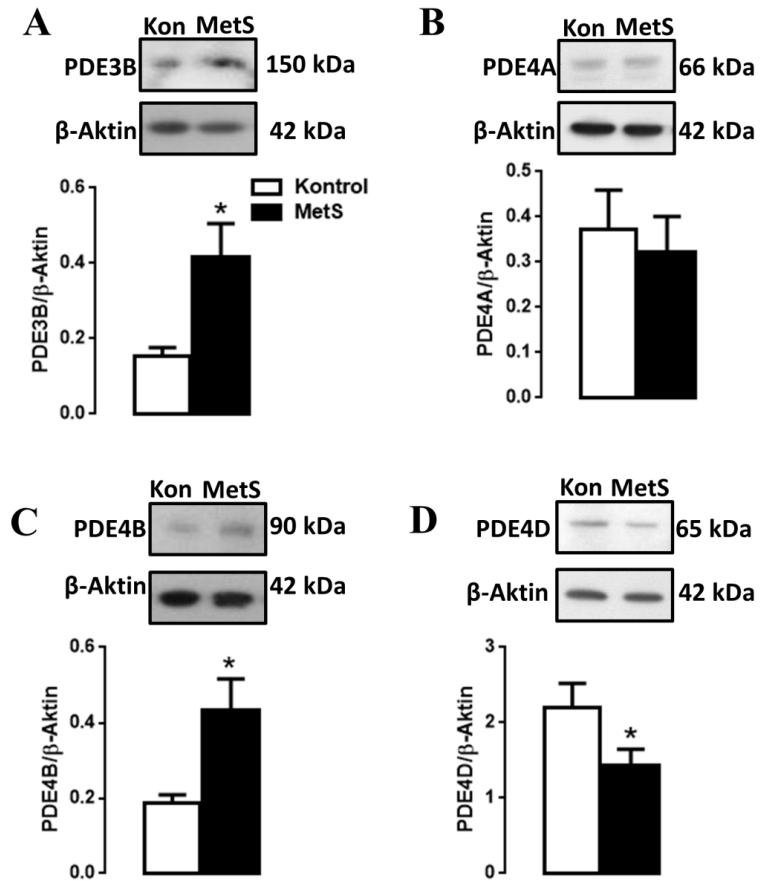


Şekil 3.18. Metabolik sendromlu (MetS) sıçan kalbinde RyR2 defosforilasyonundan sorumlu PP1A ve PP2A’nın fosforilasyon düzeyleri. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, ($n_{\text{Kontrol}}=6$, $n_{\text{MetS}}=6$).

MetS durumunda artmış RyR2, PLN ve PKA fosforilasyonlarının nedeni olarak, PP1A'nın inhibe formunun protein düzeyinin artmış olması diğer bir deyişle PP1A'nın aktif formunun protein seviyesinin azalmış olması gösterilebilir.

3.5. MetS Durumunda Fosfodiesteraz (PDE) Protein Seviyeleri

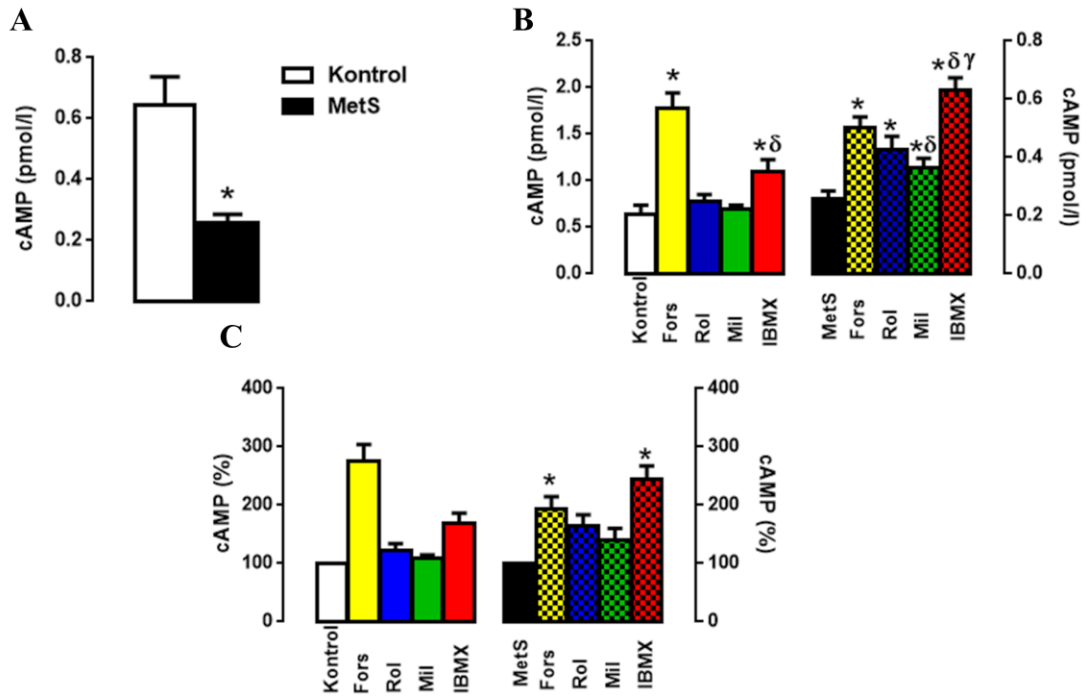
MetS durumunda PDE alttiplerinin protein miktarları incelendiğinde PDE3B'nin (Şekil 3.19A), PDE4B'nin (Şekil 3.19C) protein seviyesinin MetS grubunda kontrole göre sırasıyla 3-kat ve 2-kat arttığı, buna karşın PDE4D'nin (Şekil 3.19D) protein seviyesinin MetS grubunda kontrole göre 1,5-kat azaldığı gözlenmiştir. PDE4A'nın protein seviyesi (Şekil 3.19B) ise gruplar arasında farklılık göstermemiştir.



Şekil 3.19. Metabolik sendromlu (MetS) sıçan kalp dokusunda fosfodiesteraz (PDE) protein ifade seviyeleri. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, (n_{Kontrol} =10, n_{MetS} =10).

3.6. Metabolik Sendromlu Sıçan Kardiyomiyositlerinde Fosfodiesterazların Aktiviteleri

Fosfodiesteraz (PDE) ailesinden PDE3 ve PDE4 alttiplerinin kardiyomiyositlerde spesifik olarak cAMP'yi hidrolize ettiği bilinmektedir. MetS durumunda PDE protein seviyelerinde gözlenen değişimin fonksiyona yansıyor yansımadığını test etmek amacıyla izole kardiyomiyositlerde cAMP düzeyleri incelenmiştir. Kontrol ve MetS gruplarında ölçülen cAMP düzeyleri (Şekil 3.20A) karşılaştırıldığında MetS grubunda cAMP düzeyinin kontrole göre 2,5-kat azaldığı görülmüştür.



Şekil 3.20. İzole kardiyomiyositlerde cAMP seviyelerinin ölçümü. Metabolik sendrom (MetS) grubunun kontrol grubuna göre farkının istatistiksel değerlendirilmesi * $P < 0,05$ (A'da); kontrol veya MetS grubuna göre * $P < 0,05$, Fors yanıtına göre $^{\delta}P < 0,05$, Rol ve Mil yanıtına göre $^{\gamma}P < 0,05$ (B'de). MetS'da gözlenen Fors ve IBMX yanıtlarının kontrol grubunda ölçülen değerlerine göre değerlendirilmesi * $P < 0,05$ (C'de). Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM, ($n_{\text{Kontrol}}=8$, $n_{\text{MetS}}=8$).

PDE alttiplerinin aktivitelerini incelemek amacıyla, bir adenilat siklaz aktivatörü olan forskolin (Fors; 10^{-6} M), bir PDE4 inhibitörü olan rolipram (Rol; 10^{-5} M), bir PDE3 inhibitörü olan milrinon (Mil; 10^{-6} M) veya genel PDE inhibitörü olan IBMX (10^{-5} M) ile 15-dk süresince inkübe edilen kardiyomiyositlerde cAMP miktarları (Şekil 3.20B) ölçülmüştür. Kontrol grubu kardiyomiyositlerinde ölçülen cAMP

düzeyleri Fors inkübasyonu sonrası 2,8-kat ve IBMX inkübasyonu sonrasında 1,7-kat artarken, Rol veya Mil inkübasyonu cAMP seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmamıştır. MetS grubunda bazal durumda ölçülen cAMP miktarı Fors, Rol, Mil ve IBMX uygulamalarıyla sırasıyla 1,9-, 1,6-, 1,3- ve 2,4-kat artmıştır ve bu artışlar kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı seviyede ($P<0,05$) farklıdır (Şekil 3.20B). Kontrol grubunda IBMX-indüklü cAMP artış miktarı Fors yanıtından 1,6-kat daha düşük iken MetS’da IBMX uygulaması ile elde edilen yanıt Fors yanıtına göre 1,3-kat fazladır (Şekil 3.20B). Şekil 3.20C’de Fors, Rol, Mil ya da IBMX uygulamaları sonucunda ölçülen cAMP düzeyleri, kontrol veya MetS grubunun bazal cAMP miktarlarına göre normalize edilmiştir. Kontrolde Fors- veya IBMX-indüklü cAMP artışı MetS’da kontrole göre 1,4-kat fazla bulunmuştur.

MetS’da Fors-indüklü cAMP artışının kontrole göre daha düşük seviyede buna karşın IBMX ile tüm PDE alttiplerinin inhibe edildiği durumda ise cAMP miktarında görülen artışın daha yüksek olması, MetS deney modelinde bazal durumda artmış PDE etkinliğini işaret etmektedir.

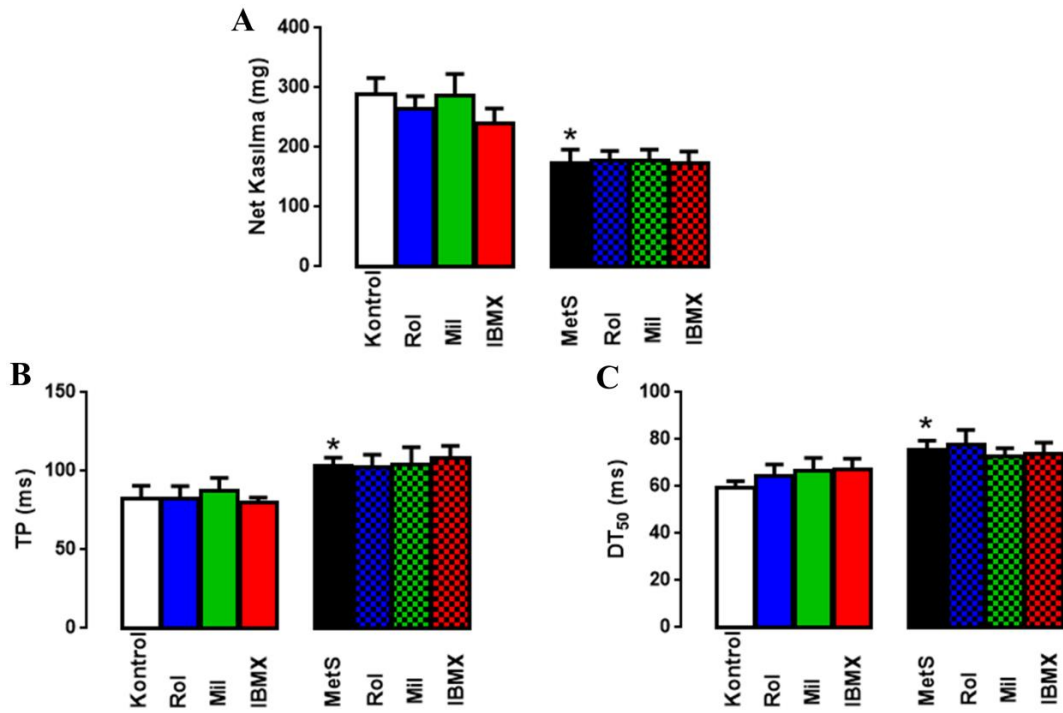
Rol ve Mil inhibitörlerinin ilgili PDE alttipleri üzerine gösterdikleri inhibisyonun eşit potensli olduğu varsayılırsa, PDE4 alttipinin global aktivitesinin MetS durumunda PDE3 alttipine göre daha fazla olduğu düşünülebilir (Şekil 3.20B).

3.7. PDE İnhibitörlerinin Papiller Kas Kasılması Üzerine Etkileri

PDE’ların kalp kası kasılma aktivitesi üzerine gösterdikleri etkiler çeşitli araştırmacılar tarafından çalışılmıştır (Ahluwalia ve ark., 1984; Beca ve ark., 2013; Beca ve ark., 2011; Lehnart ve ark., 2005; Leroy ve ark., 2011). PDE inhibitörlerinin kardiyomiyositlerde inotropik yanıtı açtığı bilinmektedir, bu nedenle kardiyomiyopati gibi kalp yetmezliği patolojilerinde PDE inhibitörlerinin terapötik ajan olarak kullanılması gündemdedir. Fakat klinikte kronik PDE inhibitör uygulamasının mortaliteye neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Lugnier,

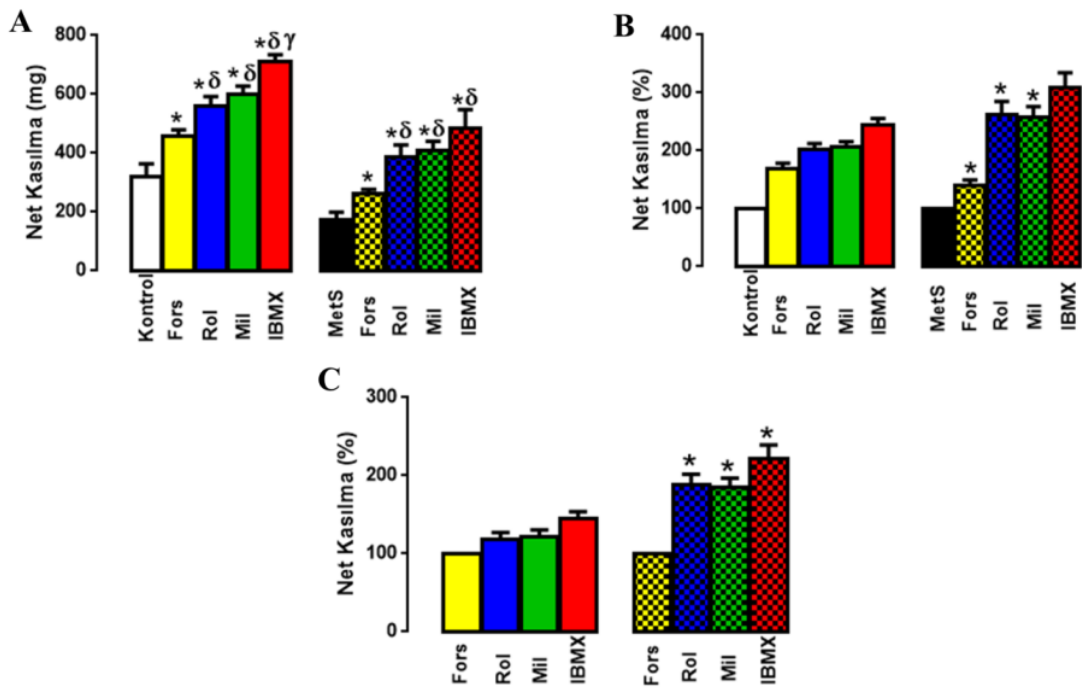
2006; Maurice ve ark., 2003). Bu nedenle PDE inhibitörlerinin kardiyak fonksiyonlar üzerine gösterdiği etkilerin moleküler mekanizmasının araştırılması önemlidir. PDE inhibitörleri ile yapılan çalışmalara baktığımızda bu zamana kadar MetS durumunda PDE etkinliğini araştırmak üzere hiçbir çalışmanın yapılmadığı görülmektedir. MetS'un popülasyondaki yaygınlığı düşünüldüğünde klinik yaklaşımların başarılı olabilmesi için PDE'ların MetS patofizyolojisindeki rollerinin araştırılması önemli görülmektedir.

PDE inhibitörlerinin kardiyak papiller kas kasılması üzerine etkilerini incelemek amacıyla gerçekleştirdiğimiz deney sonuçları Şekil 3.21-22 ve 23'de sunulmuştur. Şekil 3.21'de PDE inhibitörlerinin kontrol ve MetS durumunda bazal papiller kas kasılma kuvvetleri ya da sarsı eğrilerinin zaman parametreleri üzerine etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir.



Şekil 3.21. İzometrik papiller kas kasılmaları üzerine *in vitro* PDE inhibitörlerinin etkileri. Çubuk grafik ortalama±SEM, ($n_{\text{Kontrol}}=5$, $n_{\text{MetS}}=5$).

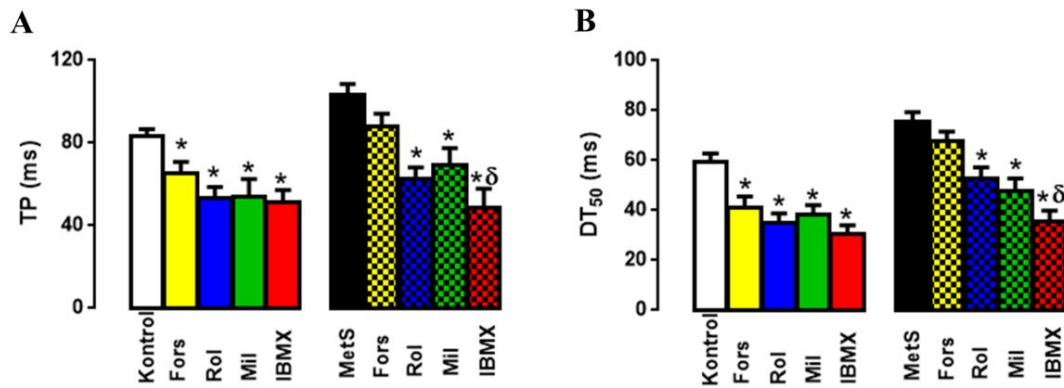
Kaynaklarda PDE inhibitör etkilerinin, daha çok adrenerjik uyarım altındayken önem kazandığını vurgulayan çalışmalar mevcuttur (Afzal ve ark., 2011; Jurevicius ve ark., 2003; Leroy ve ark., 2011; Mika ve ark., 2013; Weninger ve ark., 2013). Bu nedenle papiller kas dokusu elektriksel olarak kasılırken adenilat siklaz aktivatörü forskolin (Fors; 10^{-6} M) ile doku uyarılmış ve Fors etkisi ile gözlenen inotropik yanıt devam ederken deney ortamına ayrı ayrı olmak üzere rolipram (Rol; 10^{-5} M), milrinon (Mil; 10^{-6} M) ve IBMX (10^{-5} M) eklenerek bu inhibitörlerin kasılma yanıtları üzerine gösterdikleri etkiler değerlendirilmiştir (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. Papiller kas şeritlerinde forskolin uyarısı üzerine PDE inhibitörlerinin inotropik etkileri. Değerler ortalama±SEM olarak gösterilmiştir. *P<0,05 kontrol veya MetS grubuna göre (A), ^δP<0,05 kontrol veya MetS grubunun Fors yanıtına göre (A), ^γP<0,05 ise kontrol grubunda Rol ve Mil yanıtına göre istatistiksel olarak farkı (A), *P<0,05 MetS grubunda gözlenen yanıtların kontrol grubunda ölçülen değerlerinden istatistiksel olarak farkı (B ve C) (n_{Kontrol}=8, n_{MetS}=8).

Kontrol grubunda Fors, Rol, Mil ya da IBMX uygulaması bazal kasılma aktivitesi üzerine sırasıyla 1,6-, 2-, 2,1-, 2,4-kat pozitif inotropik etki gösterirken, MetS grubunda Fors, Rol, Mil ya da IBMX uygulaması bazal kasılma üzerine sırasıyla 1,3-, 2,6-, 2,6-, 3,1-kat pozitif inotropik etki göstermiştir (Şekil 3.22A). Her iki grupta da PDE inhibitörleri Fors yanıtı üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir artış oluşturmuştur. Gözlenen inkübasyon etkileri kontrol ve MetS grubunun bazal

kasılma değerlerine normalize edildiğinde (Şekil 3.22B), MetS’da gözlenen Fors yanıtının kontrole göre 1,2-kat az olduğu buna karşın MetS’da Rol ve Mil yanıtlarının kontrol grubuna göre sırasıyla 1,3- ve 1,3-kat yüksek olduğu bulunmuştur ve bu değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır. Şekil 3.22C’de ise PDE inhibitörlerinin Fors yanıtı üzerine gösterdikleri etkiler grup içi Fors yanıtlarına normalize edilerek verilmiştir. Buna göre MetS grubunda Fors yanıtı üzerine Rol, Mil ve IBMX inhibitörlerinin etkisi kontrol grubunda kaydedilen etkilere göre sırasıyla 1,6-, 1,5- ve 1,5-kat yüksek bulunmuştur.

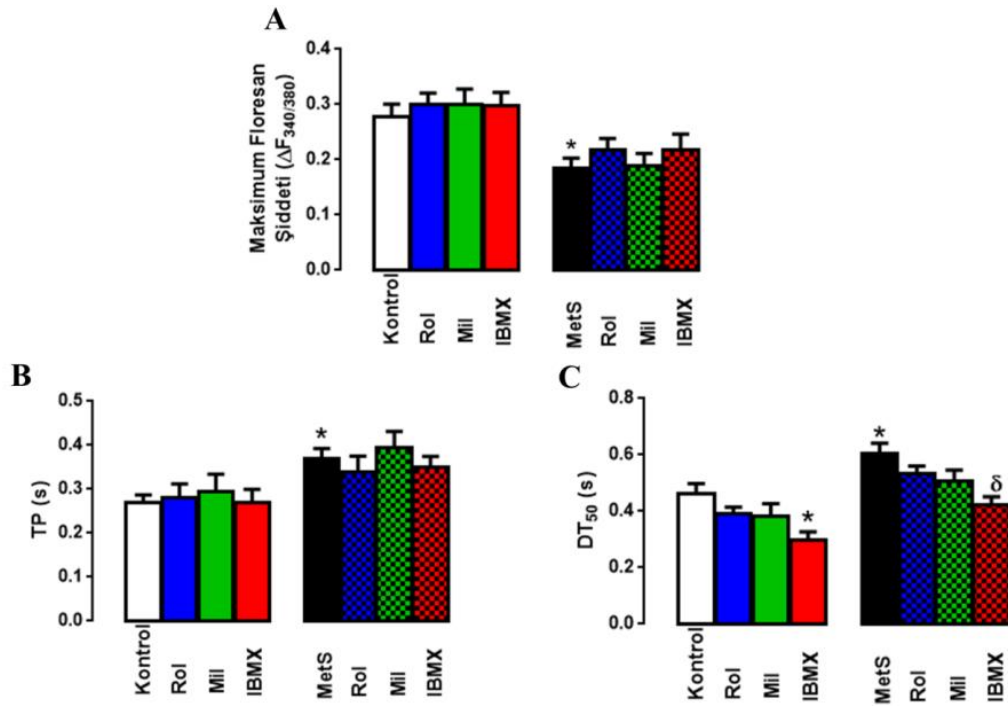


Şekil 3.23. PDE inhibitörlerinin papiller kas kasılma zaman deseni üzerine etkileri. Değerler ortalama±SEM olarak gösterilmiştir. *P<0,05 kontrol veya MetS grubuna göre, ^δP<0,05 Fors yanıtına göre istatistiksel olarak değerlendirilmesi. Fors deneylerinde n_{Kontrol}=24, n_{MetS}=22, PDE inhibitörlerinin uygulandığı deneylerde n_{Kontrol}=8, n_{MetS}=8.

Şekil 3.23’de PDE inhibitörlerinin sarsı eğrilerinin tepeye çıkış (TP) ve tepe noktasının yarısına iniş süreleri (DT₅₀) üzerine etkileri incelenmiştir. Kontrol grubunda Fors, Rol, Mil ya da IBMX uygulaması bazal durumda ölçülen TP değerini sırasıyla 1,3-, 1,6-, 1,5- ve 1,6-kat kısaltırken, MetS durumunda bu değerlerde gözlenen kısalma 1,2-, 1,6-, 1,5- ve 2,1-kat şeklindedir (Şekil 23A). Kontrolde DT₅₀ parametresi Fors, Rol, Mil ya da IBMX uygulaması ile bazal durumda ölçülen değere göre sırasıyla 1,4-, 1,7-, 1,5- ve 2-kat kısalırken, MetS’da bu değerlerde gözlenen kısalma 1,1-, 1,4-, 1,5-, 2-kat olarak ölçülmüştür (Şekil 3.23B).

3.8. PDE İnhibitörlerinin Metabolik Sendromlu Sıçan Kardiyomiyositlerinde Ölçülen Global Ca^{2+} Değişimleri Üzerine Etkileri

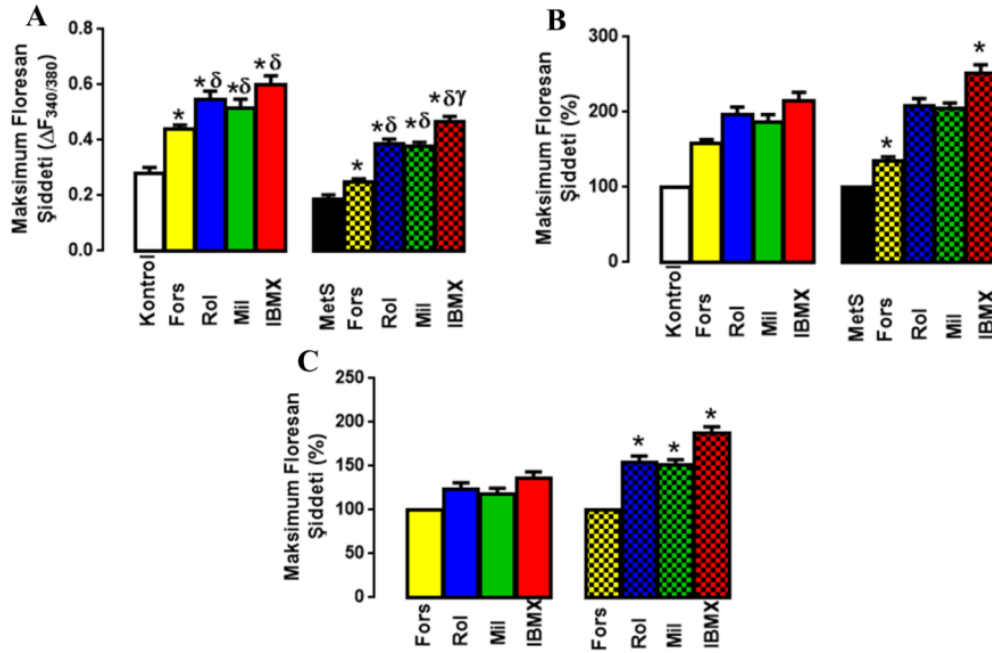
PDE inhibitörlerinin bazal Ca^{2+} değişimleri (transientleri) üzerine etkileri incelendiğinde, transient şiddeti (Şekil 3.24A) ya da transient sinyalinin tepe noktasına ulaşma süresi (TP)(Şekil 3.24B) üzerine istatistiksel olarak anlamlı etki oluşturmadıkları fakat transient sinyalinin yarıya düşmesi için geçen süreyi (DT_{50}) IBMX'in kontrollerde bazal duruma göre 1,6-kat, MetS durumunda ise 1,4-kat kısalttığı bulunmuştur (Şekil 3.24C).



Şekil 3.24. PDE inhibitörlerinin Ca^{2+} transientleri üzerine etkileri. Çubuk-grafiklerdeki değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir.* $P<0,05$ kontrol grubuna ve $^{\delta}P<0,05$ MetS grubuna göre farkların istatistiksel olarak değerlendirilmesini göstermektedir ($n_{Kontrol}=10$, $n_{MetS}=10$).

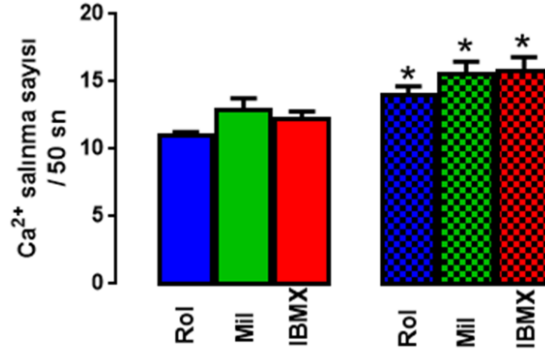
Forskolin yanıtının üzerine PDE inhibitörlerinin etkileri değerlendirildiğinde Fors, Rol, Mil veya IBMX uygulaması ile Ca^{2+} transient şiddeti kontrol grubunda bazala göre sırasıyla 1,6-, 1,9-, 1,8- ve 2,1-kat artarken, MetS grubunda 1,4-, 2,1-, 2,1- ve 2,6-kat artmıştır (Şekil 3.25A). Kontrol ve MetS gruplarında bazala göre oluşan

yüzde yanıtlar karşılaştırıldığında, yalnızca Fors ve IBMX yanıtlarının gruplar arasında farklılık gösterdiği bulunmuştur (Şekil 3.25B). Forskolin yanıtı üzerine PDE inhibitörlerinin gösterdiği etkiler karşılaştırıldığında Rol, Mil veya IBMX'in MetS grubunda kontrol grubuna göre sırasıyla 1,2-, 1,3- ve 1,3-kat artışa neden olduğu bulunmuştur (Şekil 3.25C).



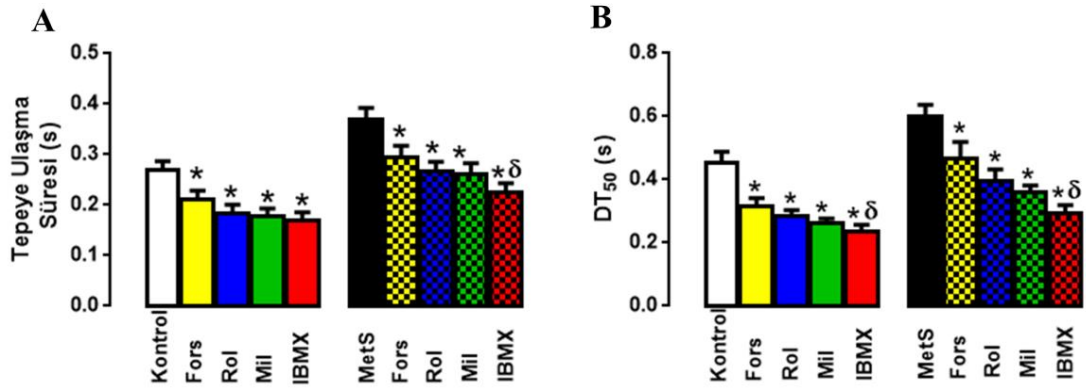
Şekil 3.25. Ca^{2+} transientleri üzerine *in vitro* PDE inhibitörlerinin etkileri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. * $P<0,05$ kontrol veya MetS grubuna göre, ^δ $P<0,05$ kontrol veya MetS grubunun Fors yanıtına göre, ^γ $P<0,05$ ise MetS grubunda Rol ve Mil yanıtına göre istatistiksel olarak farkı (A'da). * $P<0,05$ MetS grubunda gözlenen yanıtların kontrol grubunda ölçülen değerlerinden istatistiksel olarak farkını göstermektedir (C'de). Fors uygulamasının yapıldığı deneylerde $n_{Kontrol}=48$, $n_{MetS}=58$, PDE inhibitörlerinin uygulandığı deneylerde Rol, Mil, IBMX uygulaması için sırasıyla ($n_{Kontrol}=24$, $n_{MetS}=24$), ($n_{Kontrol}=15$, $n_{MetS}=20$), ($n_{Kontrol}=17$, $n_{MetS}=18$).

Elektriksel olarak 0,2 Hz frekanslı kare biçimli uyarı ile uyarılan hücrelerde Ca^{2+} transienti ile ilişkili floresans değişimleri incelenmiştir. Forskolin yanıtı kaydedilirken ortama PDE inhibitörlerinin eklenmesiyle, MetS grubunda aritmik Ca^{2+} -transientleri gözlenmiştir. PDE inhibitörlerinin ortama eklenmesini takip eden 50-sn boyunca gözlenen Ca^{2+} sinyalleri sayılmış ve MetS durumunda Rol, Mil veya IBMX eklenmesi ile oluşan sinyal sayısının kontrol grubuna göre arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($P<0,05$; Şekil 3.26).



Şekil 3.26. Ca^{2+} salınma sayısı üzerine PDE inhibitörlerinin etkileri. Çubuk grafik ortalama $\pm$ SEM. * $P<0,05$ MetS grubunda gözlenen inhibitör etkilerinin, kontrol grubunda ölçülen değerlerinden istatistiksel olarak farkını göstermektedir. Rol, Mil, IBMX uygulaması için sırasıyla ($n_{\text{Kontrol}}=24$, $n_{\text{MetS}}=24$), ($n_{\text{Kontrol}}=15$, $n_{\text{MetS}}=20$), ($n_{\text{Kontrol}}=17$, $n_{\text{MetS}}=18$).

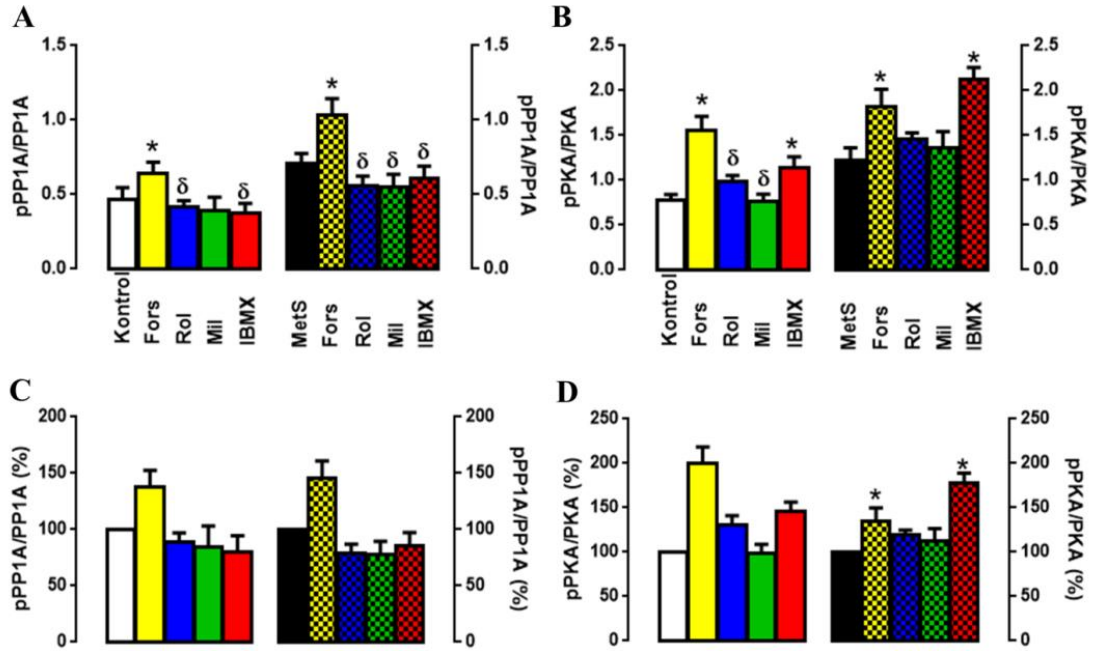
PDE inhibitörlerinin global Ca^{2+} transient zaman desenleri üzerine gösterdiği etkiler değerlendirildiğinde, Fors uygulamasının kontrol ve MetS gruplarında TP (Şekil 3.27A) ve DT_{50} (Şekil 3.27B) sürelerini kısalttığı fakat yalnızca Fors yanıtı üzerine IBMX uygulamasının her iki grupta TP süresini kısalttığı gözlenmiştir. PDE inhibitörlerinin DT_{50} süreleri üzerine etkileri değerlendirildiğinde ise yalnızca IBMX uygulamasının MetS grubunda Fors yanıtına ek olarak DT_{50} süresini kısalttığı görülmektedir.



Şekil 3.27. PDE inhibitör uygulamasının Ca^{2+} transient zaman parametreleri üzerine etkilerinin incelenmesi. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. * $P<0,05$ kontrol veya MetS grubuna göre, $^{\delta}P<0,05$ kontrol veya MetS grubunda ölçülen Fors yanıtına göre istatistiksel olarak farkı göstermektedir. Fors uygulamasının yapıldığı deneylerde $n_{\text{Kontrol}}=48$, $n_{\text{MetS}}=58$, PDE inhibitörlerinin uygulandığı deneylerde Rol, Mil, IBMX uygulaması için sırasıyla ($n_{\text{Kontrol}}=24$, $n_{\text{MetS}}=24$), ($n_{\text{Kontrol}}=15$, $n_{\text{MetS}}=20$), ($n_{\text{Kontrol}}=17$, $n_{\text{MetS}}=18$).

3.9. PDE İnhibitörlerinin Kardiyomiyositlerde Ca^{2+} Homeostazından Sorumlu Protein Fosforilasyonları Üzerine Etkileri

İzole kardiyomiyositler forskolin (Fors; 10^{-6} M), rolipram (Rol; 10^{-5} M), milrinon (Mil; 10^{-6} M) ya da IBMX (10^{-5} M) ile 15-dk inkübe edildikten sonra PP1A fosforilasyon düzeyleri (Şekil 3.28A), grup içi bazal değerlerine normalize edilmiş PP1A fosforilasyon düzeyleri (Şekil 3.28C) ile PKA fosforilasyon düzeyleri (Şekil 3.28B) ve grup içi bazal değerlerine normalize edilmiş PKA fosforilasyon düzeyleri (Şekil 3.28D) verilmiştir.



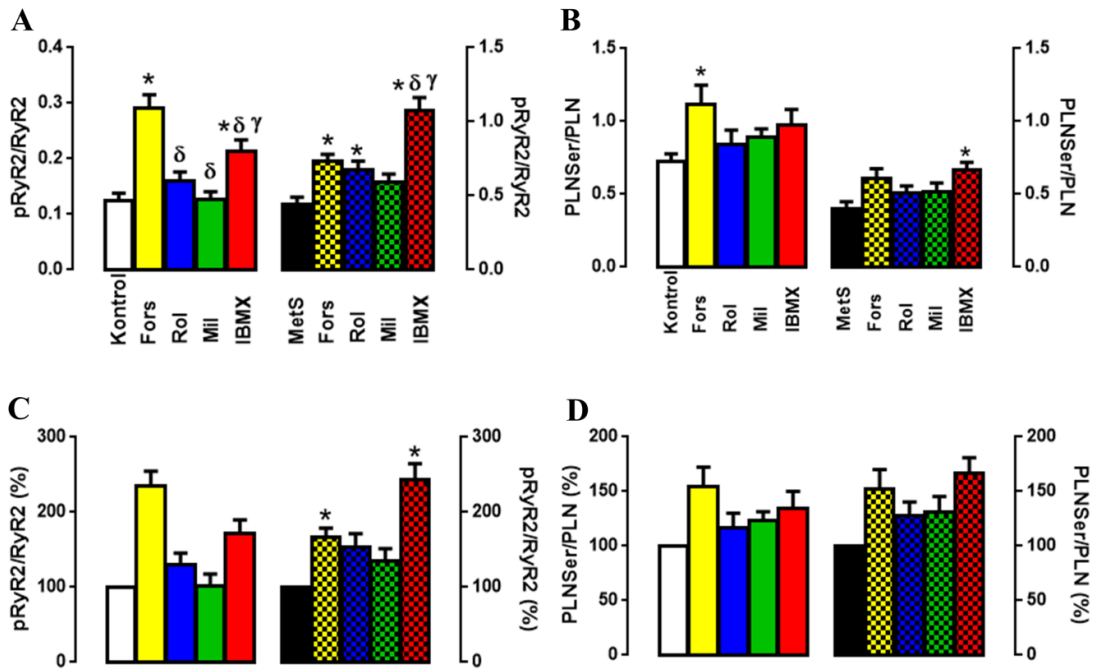
Şekil 3.28. PDE inhibitörlerinin protein fosforilasyonları üzerine etkileri. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. Kontrol veya MetS grubuna göre * $P < 0,05$, kontrol veya MetS grubunda ölçülen Fors yanıtına göre $\delta P < 0,05$ (A ve B’de), MetS grubunda gözlenen yanıtların kontrol grubunda ölçülen değerlerinden istatistiksel olarak farkını * $P < 0,05$ (D’de) göstermektedir ($n_{\text{Kontrol}}=4$, $n_{\text{MetS}}=4$).

Fors inkübasyonlarının PP1A fosforilasyon düzeyleri bazala göre, kontrol ve MetS grubunda sırasıyla 1,4- ve 1,4-kat artmıştır (Şekil 3.28A). PDE inhibitörleri ile inkübasyon her iki grupta da kontrole göre anlamlı bir değişime neden olmamıştır. Fors ve IBMX inkübasyonları PKA fosforilasyonlarını kontrolde sırasıyla 2- ve 1,5-kat arttırırken, MetS grubunda bu artış 1,5- ve 1,4-kat olarak bulunmuştur (Şekil 3.28B). Grup içi bazal değerlere göre Fors uygulamasının PKA fosforilasyonunu

arttırma oranı MetS durumunda kontrole göre anlamlı düzeyde düşük, buna karşın IBMX etkisi MetS grubunda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (Şekil 3.28D).

RyR2 fosforilasyon düzeyleri (Şekil 3.29A), grup içi bazal değerlerine normalize edilmiş yüzde RyR2 fosforilasyon oranları (Şekil 3.29C) ile PLN fosforilasyon düzeyleri (Şekil 3.29B) ve grup içi bazal değerlerine normalize edilmiş yüzde PLN fosforilasyon düzeyleri (Şekil 3.29D) verilmiştir.

Kontrol grubunda Fors uygulaması RyR2 fosforilasyonlarını 2-kat arttırırken, IBMX uygulamasında bu artış 2-kat olarak gözlenmiştir. IBMX uygulaması ile gözlenen fosforilasyon artışı Rol ya da Mil uygulaması ile gözlenmemiştir (Şekil 3.29A). MetS grubunda Fors uygulaması bazal duruma göre RyR2 fosforilasyonlarında 2-kat artışa neden olurken, Rol ve IBMX inkübasyonları ile sırasıyla 1,7- ve 2-kat fosforilasyon artışı bulunmuştur. IBMX uygulaması ile elde edilen yanıt artışı Rol ya da Mil uygulaması ile elde edilen artışa göre yaklaşık 1,4-kat büyüktür (Şekil 3.29A). Grup içi bazal değerlere göre hesaplanan fosforilasyon artış yüzdeleri MetS grubunda kontrol grubuna göre Fors ve IBMX yanıtlarında istatistiksel olarak farklıdır (Şekil 3.29C).



Şekil 3.29. PDE inhibitörlerinin protein fosforilasyonları üzerine etkileri. Değerler ortalama±SEM olarak verilmiştir. Kontrol veya MetS grubuna göre *P<0,05, kontrol veya MetS grubunda Fors yanıtına göre, ^δP<0,05, kontrol veya MetS grubunda Rol ve Mil yanıtına göre istatistiksel olarak farkı ^γP<0,05 göstermektedir (A ve B’de). MetS grubunda gözlenen yanıtların kontrol grubunda ölçülen değerlerinden istatistiksel olarak farkını *P<0,05 göstermektedir (C’de) (n_{Kontrol}=4, n_{MetS}=4).

Fosfolambanın serine bölgesinden fosforilasyonu kontrol grubunda yalnızca Fors inkübasyonu ile 1,5-kat artarken, MetS durumunda yalnızca IBMX uygulaması bazala göre 1,6-kat fosforilasyon artışına neden olmuştur (Şekil 3.29B). Kontrol ve MetS gruplarında bazal duruma göre inkübasyonlarda gözlenen PLN fosforilasyon artış yüzdeleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

4. TARTIŞMA

Diyabet, insülin hormonunun işlevi, salınımı veya her ikisinde birden meydana gelen bir hasara bağlı olarak ortaya çıkan hiperglisemi ile karakterize, etiyolojisinde birden fazla faktörün rol oynadığı metabolik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Tip 1 diyabette, çeşitli nedenlerden dolayı pankreasta insülin hormonu üretimi yetersiz iken tip 2 diyabet durumunda hücrelerde insüline direnç (insüline yanıt vermeme durumu) söz konusudur (National Diabetes Data Group, 1979). Her iki durum da hiperglisemi ile karakterizedir. Tip 2 diyabette ayrıca insülin direnci ile birlikte hiperinsulinemi de gözlenmektedir. Dutta ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada, sükroz diyeti ile tip 2 diyabet modeli oluşturulan sıçanlarda, insülin direnci ve hiperinsulinemi ile korele olarak kalbin mekanik aktivitesinde değişiklikler gözlemişlerdir (Dutta ve ark., 2001).

Klinikte gözlenen MetS etiyolojisine en yakın deneysel hayvan modeli yüksek-karbonhidrat içeren diyet ile besleme yoluyla MetS oluşturmaktır (Panchal ve ark., 2011). 1970'li yıllarda yüksek fruktoz içerikli mısır şuruplarının üretilmesi, bu şurupların yoğun tat ve düşük maliyete sahip olmaları gıda sektöründe yaygın kullanımlarına yol açmıştır. Kolay erişimli olan bu gıdaların yüksek karbonhidrat içeriğine sahip olması ve tüketiminin artmasının Dünya çapında MetS prevalansında artışa neden olduğu düşünülmektedir (Basciano ve ark., 2005; Bray, 2002). Yüksek-sükroz içeren diyet ile beslenen deney hayvanlarında MetS oluşumu çeşitli kaynaklarda rapor edilmiştir (Banos ve ark., 2005; Cardenas ve ark., 2006; Davidoff, Boyden, ve ark., 2004; de Freitas ve ark., 2008; DiMeglio ve ark., 2000; Dutta ve ark., 2001; Fang ve ark., 2005; Gonsolin ve ark., 2007; Pang ve ark., 2008; Reiser ve ark., 1981; Santure ve ark., 2002; Schwanke ve ark., 2006; Sumiyoshi ve ark., 2006). Buna karşın, uygulanan diyet protokollerinin (Çizelge 1.2) her çalışmada aynı etkiyi oluşturmadığı, hatta bazı çalışmalarda yüksek-sükroz diyetinin MetS oluşumuna yol açmadığı rapor edilmiştir (Horton ve ark., 1997). Bu nedenle çalışmamızda öncelikle 16 hafta boyunca normal diyetlerine ek olarak % 32 oranında sükroz içeren içme suyu ile beslediğimiz Wistar türü erkek sıçanlarda MetS oluşumunun

doğrulanması amaçlanmıştır ve Çizelge 1.1’de belirtilen MetS tanı kriterlerinden yola çıkılarak, sıçanlarda sistemik MetS belirteçleri ölçülmüştür (Çizelge 3.1). Deney grubunda artmış vücut ağırlığı, artmış açlık kan glukoz, insulin ve trigliserit düzeyi, hipertansiyon ve insulin direnci tespit edilerek deney hayvanlarında MetS deney modelinin oluşumu doğrulanmıştır. Besleme periyodu sonunda deney grubunda gözlenen kilo artışının kontrol grubuna göre % 10 daha fazla ve açlık kan glukozunun yaklaşık 120 mg/dL düzeylerinde olması uyguladığımız modelde tip 2 diyabetin ya da obezitenin henüz ortaya çıkmadığını göstermektedir. OGTT uygulamasında glukoz yüklemesi ile artmış kan glukoz ve insulin düzeylerinin dolaşımdan uzaklaştırılma kinetiği incelendiğinde deney grubunda glukoz intoleransının ve insulin direncinin oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2.). Deney grubu olarak başlanan tüm hayvanlarda bu değişiklikler gözlenmiştir. Bu bulgular, yüksek karbohidrat ile beslenmenin, bireylerde gözlenen pre-diyabet bulgularıyla uyumlu olduğunu göstermiştir.

Yüksek-sükroz içerikli diyet ile MetS deney modelini oluşturmayı hedefleyen çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmesi ya da deney modelinin oluşturulamamasının nedeni uygulanan protokolün süresinden kaynaklanabilir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde en az 10-hafta süren yüksek-sükroz ($\approx$ % 60) ile beslemenin metabolik sendrom oluşumuna yol açtığı sonucuna varılabilir (Dutta ve ark., 2001; Nakagawa ve ark., 2006; Robbez Masson ve ark., 2008; Santure ve ark., 2002; Selenscig ve ark., 2010).

Bu tez çalışmasının ilk hedefi, MetS oluşturulmuş sıçanlarda kalp fonksiyonlarının incelenmesidir. Bu amaç doğrultusunda histolojik veriler değerlendirildiğinde MetS durumunda kalp dokusunda miyofibril kayıpları ve organizasyon bozukluklarının oluştuğu görülmüştür. Kalp kasılma birimi olan miyofibrillerde gözlenen bu değişimler, kalp kasılma gücünün azalmasının bir nedeni olarak değerlendirilebilir (Jalil ve ark., 1989). MetS durumunda kalp doku örneklerinde gözlenen bağ doku birikimi ise dokunun elastik bileşenlerinde bozulmalar olduğunu göstermektedir ve bu değişimlerin kasılma-gevşeme süreçlerinde gözlediğimiz yavaşlamaya katkı

sağladığı düşünülebilir (Burlew ve ark., 2000; Heerkens ve ark., 1987; Nikolic ve ark., 1988; Regan ve ark., 1981; Riva ve ark., 1998; Thiedemann ve ark., 1983).

Klinikte, MetS-indüklü kardiyovasküler hastalıkların oluşumu çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (Crendal ve ark., 2014; Fung ve ark., 2009; Grundy, 2004; Sharma ve ark., 2003; Szczepaniak ve ark., 2003; Tadic ve ark., 2014). Uyguladığımız deney modelinin kalp fonksiyonu üzerine etkilerini araştırmak üzere izole organ ve doku sistemlerinde elektriksel uyarım altında kalp kasılma-gevşeme dinamiği incelenmiş ve MetS durumunda kalbin izovolumetrik ve izometrik kasılma kuvvetinin azalırken, sarsı eğrilerinin zaman parametrelerinde uzama olduğu görülmüştür (Şekil 3.7 ve Şekil 3.8). Bu sonuçlar yüksek-sükroz içerikli diyet ile indüklenen MetS modeli uygulanmış önceki çalışmalarla uyumludur (Cardenas ve ark., 2006; Gonsolin ve ark., 2007; Vasanji ve ark., 2006).

Uyguladığımız deney modelinde kalp fonksiyon bozukluklarının altında yatan nedenleri araştırabilmek için, kardiyomiyositlerin kasılma-gevşeme dinamiği ve hücre içi Ca^{2+} değişimi incelenmiştir. Kardiyomiyositlerde plazma membran depolarizasyonu voltaj kapılı L-tipi kalsiyum kanallarının (LTKK) açılması ile ekstraselüler sıvıdan hücre içine Ca^{2+} girişine neden olur. RyR2'lerindeki Ca^{2+} sensörleri Ca^{2+} 'u bağlayarak kanalın açılmasını sağlar ve sarkoplazmik retikulumdan (SR) Ca^{2+} salınımı meydana gelir. Bu durum Ca^{2+} indüklü Ca^{2+} salınımı olarak bilinir (Endo ve ark., 1970; Fabiato, 1983). Bu fenomen dikkate alındığında kalp kasılmasının efektif bir şekilde gerçekleşmesi için öncelikle LTKK fonksiyonunun önemli olduğu görülmektedir. Buna karşın, çalışmamızda MetS grubunda LTKK akımlarının değişmediği ve bu bulgunun bazı çalışma sonuçları ile de uyumlu olduğu görülmektedir (Choi ve ark., 2002; Nevelsteen ve ark., 2013).

Diğer yandan, kontrol ve MetS gruplarından izole edilen kardiyomiyositler elektriksel alan uyarımı ile uyarıldıklarında, hücre içi Ca^{2+} değişimlerinin gruplar arasında şiddet ve zaman deseni olarak farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Elektriksel uyarı ile hücre içine yaklaşık aynı oranda Ca^{2+} girişi olmasına rağmen depolardan

sitoplazmaya Ca^{2+} salınım miktarı, hızı ve artan hücre içi Ca^{2+} 'un uzaklaştırılma hızı gruplar arasında farklılık göstermiştir. MetS grubunda uyarı ile depodan salınan Ca^{2+} miktarı kontrol grubuna göre düşük iken Ca^{2+} salınma ve geri alınma kinetikleri de yavaşlamış bulunmuştur. Kalbin kasılma-gevşeme dinamiği, yapısal birim olan bağ dokusunun ve işlevsel birim olan kardiyomiyositlerin bir fonksiyonudur. MetS'lu kardiyomiyositlerde elektriksel uyarım ile gözlenen Ca^{2+} yanıtlarındaki bu değişim MetS'da gözlenen kalp fonksiyon bozukluğunun yapısal temelinin yanında işlevsel temele de dayandığını göstermektedir. Bu sonuçlar MetS deney modellerinde kaydedilen önceki veriler tarafından desteklenmektedir. Önceki çalışmalarda, yüksek şekerli diyet ile MetS deney modeli oluşturulan sıçanlarda ventriküler miyositlerin kısalma ve tekrar uzama evrelerinin kontrole göre (% 42-63) daha yavaş olduğu görülmüştür (Davidoff, Mason, ve ark., 2004; Miklos ve ark., 2012). Mellor ve ark. 2012 yılında yayınladıkları çalışmada ise Ca^{2+} transient şiddetinin kontrole göre % 42 düşük olduğunu, transientin sönümlenme fazının zaman sabitinin ise % 24 oranında uzadığını göstermişlerdir (Mellor ve ark., 2012). Bu bulgular bizim bulgularımızla uyumlu olup, kalbin mekanik aktivitesindeki MetS indüklü değişimleri açıklayabilmektedir.

Hücre içi Ca^{2+} değişimlerinde ölçülen bu değişimin nedenlerini araştırmak için sarkoplazmik retikulumdan (SR) Ca^{2+} salınan ryanodin reseptörlerinin (RyR2) ve sitoplazmik Ca^{2+} 'u SR'a geri pompalayan SERCA'nın aktiviteleri incelenmiştir. Ryanodin reseptör fonksiyonunu incelemek için kullanılan bir yöntem Ca^{2+} sparklarının değerlendirilmesidir. Dinlenme durumunda ryanodin reseptörleri stokastik bir biçimde Ca^{2+} salarlar (Shkryl ve ark., 2012; Wussling ve ark., 1996) lokal ve küçük Ca^{2+} sinyalleri olarak kaydedilen bu olay reseptörlerin fonksiyonu hakkında bilgi verir (Rios ve ark., 2002; Santiago ve ark., 2013). Gruplardan elde edilen kardiyomiyositlerde ölçülen Ca^{2+} spark parametreleri değerlendirildiğinde (Şekil 3.11) MetS durumunda spark frekansının kontrole göre artmış olması RyR2'lerinin daha aktif bir şekilde Ca^{2+} saldıgını göstermektedir. Bu çalışmada doğrudan olarak ölçmememize karşın, başkalarının yapmış olduğu çalışmalar ışığında değerlendirildiğinde, RyR2'nin hiperfosforilasyonunun, FKBP12.6 protein kaybı ya da reseptör kompleksinde PDE4D eksikliğininin spark frekansının

artmasına ve aritmi oluşumuna yol açması ile uyumlu görünmektedir (Beca ve ark., 2011; Carlisle Michel ve ark., 2004; Chelu ve ark., 2004; Elliott ve ark., 2011; Lehnart ve ark., 2005; Marx ve ark., 2000; Santiago ve ark., 2013; Wehrens ve ark., 2006; Wehrens ve ark., 2004; Xiao ve ark., 2004). Yapılan çeşitli çalışmalarda, patolojik koşullar altında olan kardiyomiyositlerde, Ca^{2+} spark frekansının artması SR'daki Ca^{2+} miktarının azalmasına ve hücre içi Ca^{2+} miktarının artmasına yol açtığı gösterilmiştir. Bu nedenle, bulgularımız kapsamında SR'daki Ca^{2+} miktarının azalmasının bir fonksiyonu olarak Ca^{2+} spark şiddetinin azalması da beklenen bir sonuç olarak değerlendirilebilir. Bu bulgular MetS sahip memeli kardiyomiyositlerinde Ca^{2+} spark parametreleri ilk kez bu çalışmada incelenmiştir. Bizim bu bulgulara paralel olarak, tip 2 diyabet modelinde izole kardiyomiyositlerde Ca^{2+} spark frekansının arttığı ve Ca^{2+} spark şiddetinin azaldığı gösterilmiştir (Pereira ve ark., 2006).

Ca^{2+} spark deneyleri RyR2'lerinin fonksiyonlarının MetS durumunda bozulduğunu göstermektedir. RyR2'lerinden kontrolsüz Ca^{2+} salınımı hücre içi Ca^{2+} miktarının artmasına neden olmuştur. Kaynaklarda 10 mM kafeinin RyR2'lerini uyararak depodaki Ca^{2+} 'un salınmasına neden olduğunu ve bu sayede SR Ca^{2+} miktarının tayin edilebildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Cros ve ark., 2014; Venetucci ve ark., 2007). MetS durumunda SR Ca^{2+} miktarını tayin edebilmek amacıyla dinlenim durumundaki kardiyomiyositlere 10 mM kafein uygulanmış ve MetS durumunda kafein yanıt şiddetlerinin kontrole göre daha düşük, yanıtın oluşma ve sönümlenme sürelerinin ise daha uzun olduğu gözlenmiştir. Gözlenen bu yanıt SR Ca^{2+} miktarındaki azalmayla açıklanabileceği gibi RyR2'leri ve kafein etkileşiminde ortaya çıkan bir problemten de kaynaklı olabilir. Bunu destekler nitelikte, Dinçer ve ark. (2006) MetS durumunda köpek kardiyomiyositlerinde RyR2'lerinin kafein bağlama kapasitesinin düştüğünü göstermişlerdir (Dincer, Araiza, Knudson, Shao, ve ark., 2006).

Kafein uyarımı ile ya da elektriksel uyarı ile hücre içinde artan Ca^{2+} 'un uzaklaştırılma hızlarında gözlenen uzamanın temel olarak sodyum-kalsiyum değiş-tokuşcusu (NCX) ya da SERCA aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Kuster

ve ark., 2010; Maltsev ve ark., 2013). SERCA, SR'dan salınan Ca^{2+} 'un depoya geri pompalanmasını NCX ise artan sitoplazmik Ca^{2+} 'un hücre dışına atılmasından sorumlu pompalardır. MetS durumunda SERCA aktivitesinin azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Balderas-Villalobos ve ark., 2013; Dutta ve ark., 2001). Uyguladığımız MetS deney modelinde bozulmuş Ca^{2+} homeostazında SERCA'nın rolünü araştırmak üzere NCX'in bloke edildiği deney şartlarında kafein yanıtlarının sönümlenme süreleri incelenmiştir (Şekil 3.13). Deney sonuçları analiz edildiğinde önceki çalışmalarla uyumlu olarak MetS durumunda kafein sönümlenme süresinin daha uzun olduğu diğer bir deyişle SERCA aktivitesinin daha düşük olduğunu ortaya konmuştur.

Yapılan çalışmalar RyR2'lerinin bazı modifikasyonlar altında sızıntılı duruma geçtiğini göstermektedir (Ai ve ark., 2005; Andersson ve ark., 2011; Chelu ve ark., 2004; Marx ve ark., 2000; Wehrens ve ark., 2006). Bu durumda hücre içi bazal Ca^{2+} miktarının ve Ca^{2+} spark frekansının arttığı bilinmektedir. Bu hususta yaptığımız incelemelerin sonuçları, MetS deney modelinde hem bazal Ca^{2+} miktarının hem de Ca^{2+} spark frekansının artması RyR2'lerinin sızıntılı durumda olabileceğini desteklemektedir. Kaynaklarda tetracaine (1 mM) uygulaması ile RyR2'lerinin bloke olduğu ve mevcut sızıntının ortadan kaybolduğu gösterilmiştir (Shannon ve ark., 2003). Bu bilgi doğrultusunda izole kardiyomiyositlere tetracaine ve kafein uyguladığımız deney protokolünde, kontrol ve MetS grupları için Ca^{2+} sızıntı miktarları hesaplanmış ve MetS durumunda kontrole göre artmış Ca^{2+} sızıntısı tespit edilmiştir. Bu deney protokolü MetS'lu kardiyomiyositlerde ilk kez uygulanmıştır. Dinçer ve ark. yayınladıkları çalışmalarda MetS'lu deney hayvanlarında RyR2'lerinin hiperfosforile olduğu rapor edilmiştir (Dincer, Araiza, Knudson, Shao, ve ark., 2006; Dincer, Araiza, Knudson, Molina, ve ark., 2006) ve RyR2'lerinin hiperfosforile olduğu durumda sızıntılı konuma geçtiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (Marx ve ark., 2000; Wehrens ve ark., 2006). Uyguladığımız MetS deney modelinde gözlediğimiz Ca^{2+} sızıntısının nedeni olarak RyR2'lerinin hiperfosforile olması hipotezini test etmek amacıyla, homojenize edilmiş sıçan kalplerinde RyR2'lerinin fosforilasyon miktarları araştırılmış ve MetS durumunda RyR2'lerinin hiperfosforile olduğu bulunmuştur. Bu veri MetS grubunda gözlenen artmış Ca^{2+}

sızıntısını açıklayabilmektedir. Marx ve ark. (2000) RyR2'lerinin stabilitesinden sorumlu olan FKBP12.6 proteininin kaybı ile RyR2'lerinin aktivitelerinin arttığı ve Ca^{2+} salma senkronizasyonunun bozulduğunu göstermişlerdir (Marx ve ark., 2000). Bu çalışmayla uyumlu olarak MetS'lu sıçan kalp homojenatlarında FKBP12.6 protein miktarının kontrole göre anlamlı düzeyde azaldığı gözlenmiştir. Uyguladığımız MetS modelinde gözlenen sızıntılı RyR2 durumunun, reseptörün hiperfosforile olması ve stabilizatör proteininin kaybı ile oluştuğu hipotezi desteklenmiştir.

RyR2'leri artmış adrenerjik uyarım altında aktive olan PKA ya da CaMKII tarafından fosforile edilerek module edilir (Wehrens ve ark., 2006; Wehrens ve ark., 2004). Dinçer ve ark yaptıkları çalışmada, MetS durumunda artmış adrenerjik uyarım ile aktive olan PKA'nın RyR2 hiperfosforilasyonuna yol açtığı öne sürülmüştür (Dincer, Araiza, Knudson, Shao, ve ark., 2006). MetS durumunda PKA fosforilasyonu (aktivasyonu) kontrole göre artmış bulunurken CaMKII fosforilasyon miktarı değişmemiş bulunmuştur. Kaynaklarda MetS deney modelinde RyR2 durumunu inceleyen tek çalışma Dinçer ve ark yaptığı çalışmalardır (Dincer, Araiza, Knudson, Shao, ve ark., 2006; Dincer, Araiza, Knudson, Molina, ve ark., 2006), ancak bu deneylerde MetS oluşumu için yüksek-yağ içerikli diyet kullanmışlardır bu bağlamda bu tez çalışması yüksek-sükroz içerikli diyet ile RyR2'lerinin fonksiyonunu gösteren ilk çalışmadır.

MetS deney modellerinde, Ca^{2+} homeostazını inceleyen çalışmalar özellikle, SERCA aktivitesi ve regülasyonunu belirlemeye yöneliktir. Miklos ve ark. MetS durumunda Ca^{2+} transientlerinin sönümlenme süreleri ve hızlarını inceledikleri çalışmada, Ca^{2+} 'un uzaklaştırılma kapasitesinde azalma olduğunu ve SERCA2 ya da fosforillenmiş fosfolamban (pPLN) protein seviyesinin arttığını rapor etmişlerdir (Miklos ve ark., 2012). Fakat kaynaklarda MetS deney modellerinde ölçülen SERCA ve pPLN protein miktarları hakkında çelişkili sonuçlar vardır. Örneğin; Mellor ve ark. yayınladıkları çalışmaya göre ise 12-hafta fruktoz ile beslenen sıçanlarda SERCA ve pPLN protein miktarında azalma olduğu gösterilmiştir (Mellor ve ark., 2012). MetS'lu kalp homojenatlarında SERCA ve CaMKII tarafından fosforillenmiş

PLN protein miktarında kontrol grubuna göre fark gözlenmezken PKA tarafından fosforillenen PLN protein seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. Bulgularımız Mellor ve ark. yayınladıkları sonuçlar ile uyumlu iken Miklos ve ark. sonuçlarına terstir. Bu durumun açıklaması uygulanan besleme protokolünün süresi olabilir. Miklos ve ark. sıçanları 6-hafta, Mellor ve ark. ise 12-hafta beslemiştir. Bu nedenle 16-haftalık besleme protokolü uyguladığımız sıçanlardan elde ettiğimiz verilerin, uzun besleme süreli çalışma (Mellor ve ark.) ile uyumlu çıkması gözlenen patofizyolojinin zaman bağımlı ortaya çıktığını düşündürmektedir. MetS deney modelinde PKA aktif iken PLN'in PKA tarafından fosforillenmiş formunun protein seviyesinin azalması bir çelişki gibi gözükse de artmış protein fosfataz (PP1) aktivitesinin bu sonuca yol açtığı düşünülebilir.

Klinikte non-spesifik PDE inhibitörü olan teofilinin astım ve pulmoner rahatsızlıklarda kullanılması ile bu inhibitörlerin kardiyak aritmi ve mortalite gibi ciddi yan etkilerinin gözlenmesi PDE inhibitörlerinin terapötik ajan olarak uygulanmasını kısıtlamış ve bu konuda mekanistik çalışmaların yapılması gereğini doğurmuştur (Barnes, 2003). PDE'lerin kalp patolojilerdeki durumlarını inceleyen bir çalışmada kalp yetmezliği modeli oluşturulan sıçanlarda PDE3 ve PDE4'ün kardiyak beta-adrenerjik yanıtlar üzerine gösterdikleri etkiler değerlendirilmiş ve sonuç olarak sağlıklı sıçanlarda her iki PDE alt tipinin inhibisyonu ile pozitif inotropik ve lusiotropik etki gözlenirken kalp yetmezliği olan sıçanlarda yalnızca PDE3 inhibisyonunun etki oluşturduğu rapor edilmiştir (Afzal ve ark., 2011). Molina ve ark. 2012 yılında yayınladıkları çalışmada ise PDE4'ün insan atriyal miyositlerinde hücre içi Ca^{2+} ve cAMP seviyesinin düzenlenmesinde önemli olduğunu ve PDE4 eksikliğinde atriyal fibrilasyon görülme olasılığının arttığını göstermişlerdir (Molina ve ark., 2012). Benzer bir çalışmada Lehnart ve ark. tarafından mutant farelerde yapılmıştır. Araştırmacılar PDE4D eksikliği oluşturdukları farelerde kardiyomiyopati ve egzersiz-indüklü aritmilerin ortaya çıktığını göstermişlerdir (Lehnart ve ark., 2010). Anjiotensin II ile oluşturulan kardiyak hipertrofi modelinde ise PDE4 aktivitesinin kontrole göre % 22 artış gösterdiği bilinmektedir (Mokni ve ark., 2010).

Tez çalışmasının ikinci bölümünde, MetS ya da obezite gözlenen kalp fonksiyon bozukluğunda PDE'lerin rolünün olup olmadığının incelenmesi hedeflenmiş olup, öncelikle kalp dokusunda, en yüksek seviyede ifade olduğu ve Ca^{2+} homeostazı üzerine düzenleyici etkileri olduğu başka patoloji modellerinde gösterilen (Mika ve ark., 2013; Mika ve ark., 2012) PDE3 ve PDE4'ün protein seviyeleri incelenmiştir. MetS'lı sıçan kalp dokusunda protein seviyeleri artan PDE'ler PDE3B, PDE4B ve PDE4D olarak tespit edilmiştir. Şimdiye kadar MetS, obezite, tip 1 veya tip 2 diyabet durumlarında PDE'lerin kalp ifade düzeyleri ve aktiviteleri hakkında yapılan tek çalışma, Nagaoka ve ark. 1998 yılında yayınladıkları insülin direncine sahip obez sıçanlarda PDE3B mRNA seviyesinin 12.haftada artmış buna karşın PDE3 ve PDE4 aktivitesinin kalp dokusunda kontrole göre farklı olmadığını rapor edildiği çalışmadır (Nagaoka, Shirakawa, Kasuya, ve ark., 1998) ve bu çalışmanın bulguları deney sonuçlarımızı desteklemektedir. Bu çalışmanın dışında bu hususta başka bulguların olmaması, henüz bu konudaki detaylı çalışmaların başlangıç düzeyinde olduğunu düşündürmektedir. Bu eksikliğin PDE ailesinin çok geniş olmasından, hücre içi çeşitli sinyal-yolaklarında çeşitli görevler almasından, ve özellikle etkilerinin hücre içi-lokalizasyon bağımlı olmasından kaynaklandığını işaret eden bazı önemli çalışmalar mevcuttur (Manganiello, Murata, ve ark., 1995; Marcantoni ve ark., 2009; Maurice ve ark., 2014; Maurice ve ark., 2003). Literatürde bu hususta yapılan bazı çalışma örnekleri arasında, örneğin PDE4D ifade etmeyen farelerde yapılan bir çalışmada, bu farelerin sol ventrikül kasılma kuvveti ve kasılma-gevşeme hızlarında artış gözlenirken, RyR2 fosforilasyonlarında azalma olduğu bildirilmiştir (Beca ve ark., 2011). Bu çalışma sonuçları PDE protein ekspresyon seviyesi ile RyR2 arasındaki bir tür ilişkinin kalbin mekanik aktivitesi üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Sol ventrikül kasılma kuvvetinde artış, kasılma hızında yavaşlama ve RyR2 hiperfosforilasyonu gözlediğimiz MetS deney modelinde PDE4D protein miktarının artmış olması Beca ve ark. bulgularıyla uyumludur. Bir başka çalışmada, örneğin PDE4D ve PDE4B ifade etmeyen farelerde Ca^{2+} transientlerinin sönümlenme sürelerinin (DT_{50}) kısaldığı gösterilmiştir (Molina ve ark., 2012), ki bu bulgu da yine bizim deney modelimizde gözlediğimiz bulgularla (örneğin DT_{50} süresinin uzaması ve PDE4D ve PDE4B protein seviyesinin artması gibi), uyumlu olduğu görülmektedir (Leroy ve ark., 2011).

MetS'lu sıçan kalp dokusunda ölçülmüş olan PDE protein seviyelerindeki artışın kalbin mekanik aktivitesinde ve hücre içi gözlenen Ca^{2+} değişimlerinde rolü olup olmadığını anlamak amacıyla, kardiyomiyositlerde PDE inhibitörleri varlığında cAMP düzeyleri ölçülmüş ve bazal durumdaki cAMP düzeyleri MetS grubunda kontrole göre % 50 azalmış bulunmuştur. Bu azalmanın altında yatan nedenlerden birisi, adenilat siklaz aktivitesinde gözlenen azalma ya da PDE aktivitesinin artması olabileceğini düşündürmektedir. Çünkü, PDE inhibitörleri (rolipram, milrinon ya da IBMX) bazal cAMP düzeylerini MetS'lu grupta önemli derecede arttırırken, kontrol grubunda PDE inhibitörlerinden yalnızca IBMX bazal cAMP düzeyini arttırmıştır. Başka bir ifade ile, yüksek-sükroz alımının, sıçan kalp dokusunda hem PDE3 ve PDE4'ün protein seviyesinin ve hem de bazal aktivitesinin artmasına neden olduğunu göstermektedir. Diğer yandan, hem bir adenilat siklaz aktivatörü olan forskolin varlığında cAMP yanıtının ve hem de genel bir PDE inhibitörü olan IBMX yanıtının MetS grubunda daha yüksek olması, MetS durumunda artmış PDE aktivitesini doğrulamaktadır. Adenilat siklaz aktivitesinin her iki grupta aynı olduğu varsayılırsa forskolin uyarımı ile artan cAMP düzeyinin MetS'da düşük olması, bir olasılıkla aktif PDE'lar tarafından üretilen cAMP'nin hidrolize olduğu ve bu sayede seviyesinin düşük olarak ölçülebileceğini işaret etmektedir. Diğer yandan, zaten düşük olan bazal cAMP bu grupta daha düşük PDE ölçülebileceğini de işaret etmektedir. Bu olasılık göz önünde tutularak bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu bulgular, bu model çalışmasında ilk kez ele alınmış olduğundan, başlangıç bulgular olarak kabul edilerek ileriki çalışmalara önemli bir zemin hazırladığı göz önünde tutulmalıdır.

Bu hususta bir başka önemli çalışmada, bazal durumdaki hücrelerde PDE'ların aktivitelerinin kasılma fonksiyonlarına yansımadağı, ancak sıklık nükleotitlerin artışı ile sonuçlanan bir uyarım sonrasında aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir (Leroy ve ark., 2011; Verde ve ark., 1999). Bu verilerle uyumlu olarak elektriksel olarak kasılan izole papiller kas şeritleri veya izole kardiyomiyositler PDE inhibitörleri ile süperfüze edildiğinde kasılma parametrelerinde bir farklılık olmadığı görülmüştür. Buna karşın, bu örnekler forskolin ile uyarıldıktan sonra PDE inhibitörlerinin ortama eklenmesi ile inhibitörlerin inotropik ve lusiotropik etkileri belirgin olarak ortaya

çıkmiştir. Bizim çalışmamızda, kaydedilen forskolin yanıtının üzerine PDE inhibitörlerinin etkileri gruplar arasında değerlendirildiğinde MetS grubunda her üç inhibitörün de inotropik etkisi kontrol grubunda gözlenen inhibitör etkilerine göre yüksek bulunmuştur. Bu veriler ışığında MetS’da gözlenen kontraktıl fonksiyon ve Ca^{2+} homeostaz bozukluğunda artmış PDE aktivitesinin rolü olabileceğini düşündürmektedir. Papiller kasta elektriksel uyarı ile elde edilen sarsı eğrilerinin zaman desenleri PDE inhibitörleri varlığından etkilenmezken forskolin uyarımının ardından tepeye çıkış süresi (TP) ve yarı gevşeme süresinde (DT_{50}) gözlenen kısalma yalnızca MetS grubunda IBMX uygulaması ile daha da kısalmıştır. Ca^{2+} transientlerinin zaman desenlerinde de benzer etkiler kaydedilmiştir yalnız farklı olarak elektriksel uyarım altında iken MetS’lu kardiyomiyositlerde DT_{50} parametresinin IBMX uygulaması ile kısaldığı görülmektedir. Papiller kas kasılmalarında gözlenmeyen bu etkinin Ca^{2+} transient ölçümlerinde gözlenmesinin nedeni izometrik kasılma yanıtlarının makro düzeyde olması ve farklı komponentlerinin olmasına karşın Ca^{2+} transientlerinde tek hücreden hassas bir şekilde sadece Ca^{2+} sinyallerinin kaydedilmesi olarak düşünülebilir.

Ca^{2+} transientlerinin TP ve DT_{50} süreleri forskolin uygulaması ile kısalırken IBMX uygulaması TP süresini MetS’lu kardiyomiyositlerde, DT_{50} süresini ise hem kontrol hem de MetS grubunda daha da kısaltmıştır. Bu gözlenen etkinin olası nedenleri olarak RyR2 ve SERCA aktiviteleri ile PDE inhibitörleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle PDE inhibitörleri varlığında RyR2 ve SERCA’nın fosforilasyon düzeyleri ölçülmüştür. Forskolin uygulaması protein fosfataz1 (PP1), PKA, RyR2 ve fosfolamban (PLN) fosforilasyon düzeylerinin yükselmesine, genel bir PDE inhibitörü olan IBMX ise her iki grupta PKA, RyR2 ve PLN fosforilasyon düzeylerinin artmasına neden olmuştur. PDE4 inhibitörü rolipram ise yalnızca MetS durumunda RyR2 fosforilasyonunda artışa neden olmuştur. IBMX uygulaması ile Ca^{2+} transientlerinin şiddetlerinde görülen artış, PLN fosforilasyonunun artması ile SERCA’nın aktivitesinin artması ve depoya daha fazla Ca^{2+} pompalamasıyla açıklanabilir. Ayrıca SERCA aktivitesinin PLN fosforilasyonu ile artması IBMX uygulaması ile Ca^{2+} transientlerinin DT_{50} sürelerinde gözlenen kısalmayı açıklayabilir. PLN ve RyR2 fosforilasyon düzeylerinin IBMX uygulaması ile artması

yine IBMX uygulaması ile artan PKA fosforilasyonu ile açıklanabilir. Diğer yandan, RyR2 fosforilasyonunun yükselmesi durumunda kardiyak aritmilerin arttığı bilinmektedir (Lehnart ve ark., 2005; Venetucci ve ark., 2007). MetS durumunda PDE inhibitörlerinin ortamda olması Ca^{2+} salınma sayısını arttırmış yani kardiyomiyosit düzeyinde aritmilere neden olmuştur. Rolipram ve IBMX uygulaması ile artan RyR2 fosforilasyonu bu aritmilerin nedeni olarak yorumlanabilir. PDE3 inhibitörü milrinonun RyR2 fosforilasyonlarını etkilemezken PDE4 inhibitörü rolipramın fosforilasyonları arttırması, PDE4'ün SR ve RyR2 kompleksinde bulunabileceği ve lokal olarak bu organellerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynayabileceğini gösteren çalışmalarla uyumlu bir sonuçtur (Carlisle Michel ve ark., 2004; Lehnart ve ark., 2005; Marcantoni ve ark., 2009).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda yüksek şükroz içerikli diyet ile sıçanlarda metabolik sendrom (MetS) deney modeli oluşturulmuş ve MetS durumunda kalp fonksiyonları incelenmiştir. MetS-indüklü kalp fonksiyon bozukluğunun altında yatan nedenlerin araştırılması amacıyla izole kardiyomiyositlerde Ca^{2+} homeostazından sorumlu olan protein fonksiyonları elektrofizyolojik ve moleküler teknikler kullanılarak incelenmiştir. MetS deney modelinde fosfodiesterazların ifade düzeyleri ve aktiviteleri aktiviteleri ölçülerek, kalp fonksiyon bozukluğunda cAMP'yi hidrolize eden PDE'lerin olası rolü ile ilgili ön bilgiler elde edilmiştir. Bu bulgular, bu model çalışmasında ilk kez ele alınmış olduğundan, PDE'lerin protein ve aktivitelerinde gözlenen değişikliklerin MetS durumunda gözlenen kalbin mekanik aktivitesinde rol oynayıp oynamadığını ileri sürmek için daha ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu nedenle, buradaki verilerimiz başlangıç bulgular olarak kabul edilerek ileriki çalışmalara önemli bir zemin hazırladığı göz önünde tutulmalıdır.

MetS deney modeli gelişiminin doğrulanması, sıçanlarda insulin direnci, glukoz intoleransı, hipertansiyon, hipertrigliseridemi ve hiperglisemi olgularının oluşumunun tespit edilmesi ile mümkün olmuştur. MetS deney modelinde sistemik oksidatif stres varlığı ve miyokardiyumun yapısal değişimleri tespit edilmiştir.

İzovolumetrik ve izometrik kardiyak kasılma-gevşeme parametreleri incelenerek MetS deney modelinde kalp fonksiyon bozukluğu tespit edilmiş ve bu patofizyolojinin nedenlerini araştırmak üzere izole kardiyomiyositlerde elektriksel uyarı ile oluşan hücre içi Ca^{2+} değişimleri (Ca^{2+} transient) ve lokal Ca^{2+} salınımları (Ca^{2+} spark) ile ryanodin reseptör (RyR2) ve sarkoendoplazmik Ca^{2+} ATPaz (SERCA) fonksiyonları ölçülmüştür. MetS durumunda Ca^{2+} transient şiddetlerinde azalma, zaman desenlerinde uzama gözlenirken bazal Ca^{2+} seviyesinin ise artmış olduğu belirlenmiştir. Ek olarak MetS'da Ca^{2+} spark frekansının artarken, şiddetinin azalması MetS-indüklü Ca^{2+} homeostaz bozukluğunu göstermiş ve yapılan deneyler

sonucunda bu bozukluğun nedeninin MetS durumunda aktivite veya protein seviyeleri değişmiş olan RyR2 ve SERCA olduğu ortaya konmuştur.

MetS deney modelinde, kalp dokusunda PDE3 ve PDE4'ün protein seviyesinin ve aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. PDE3 inhibitörü milrinon, PDE4 inhibitörü rolipram ve genel PDE inhibitörü IBMX uygulamalarının kasılma parametreleri ve Ca^{2+} transientleri üzerine gösterdikleri etkinin MetS durumunda kontrole göre daha yüksek olması, MetS'da PDE'lerin ölçülen bu parametreler üzerine daha fazla etkisinin olduğunu düşündürmüştür. cAMP ölçümleri ve protein fosforilasyon verilerimiz ışığında ve PDE inhibitörleri ile kasılma ve Ca^{2+} homeostazı ile ilgili parametreler üzerinde gözlenen etkiler birarada değerlendirildiğinde, MetS durumunda artmış adrenerjik uyarımın kalpte cAMP miktarını arttırarak protein kinaz A (PKA) aktivasyonuna neden olabileceği ve bu şekilde aktif-PKA'nın RyR2 ve fosfolamban gibi hedef proteinlerin fosforilasyonuna neden olarak kalp fonksiyon bozukluğunda rol oynayabileceğini düşündürmektedir. PDE'lerin MetS deney modelinde kardiyak ifade düzeyleri, hücre içi dağılımları ve bugüne kadar yapılan çalışmalarda incelenmemiş bir konudur. MetS olgusunda kalbin artmış adrenerjik uyarım altında olduğu bilinmektedir. Adrenerjik sistemde, siklik nükleotitlerin sinyalin hücre içi hedeflere iletilmesindeki ve PDE'lerin hücre içi cAMP düzeyinin kontrol etmesindeki rolü düşünüldüğünde MetS'un PDE aktivitesi üzerine nasıl etki ettiği ya da PDE etkinliğinin MetS-indüklü oluşan kalp fonksiyon bozukluklarına katkısının belirlenmesi terapötik yaklaşımların geliştirilmesi ve ilaç yan etkilerinin değerlendirilebilmesi bakımından oldukça önemlidir. Çalışmamızda MetS cAMP düzeylerini düşük bulunmuş ve bu etki adenilat siklaz aktivitesinin her iki grupta eşit olduğu varsayıldığında PDE etkinlik artışının bir fonksiyonu olarak değerlendirilmiştir. İleriki çalışmalarda adenilat siklaz aktivitesinin incelenmesi, MetS durumunda kardiyomiyositlerin hücre içi azalmış cAMP düzeyine katkı sağlayan mekanizmaların belirlenebilmesi için gereklidir. Kaynaklarda PDE aktivitelerini değerlendiren çalışmalarda çelişkili sonuçlarla karşılaşılacaktır. Bunun nedeninin PDE'lerin lokal etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda tüm hücre homojenatında ölçülen PDE miktarı ile hücre bölümlerinde ölçülen PDE miktarlarının uyumlu olmadığı, sarkoplazmik retikulum

ya da L-tipi kalsiyum kanal mikro çevresindeki PDE miktarlarının genel PDE miktarlarından farklı olabileceği ve bu hücre bölümlerinde gözlenen PDE miktar ve aktivite değişimlerinin gözlenen patofizyolojiye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Lehnart ve ark., 2005; Leroy ve ark., 2011; Marcantoni ve ark., 2009; Maurice ve ark., 2014; Muller ve ark., 1992; Rababa'h ve ark., 2013). Bu nedenle MetS durumunda PDE etkinliğinin ayrıntılı olarak incelenmesi hedeflenen ileriki çalışmalarda PDE miktar ve etkinlikleri hücre bölümlerinde değerlendirilmelidir.

ÖZET

Diyabet Kaynaklı Kalp Fonksiyon Bozukluğunda Hücre İçi İyon Derişimleri İle Fosfodiesterazların Aktiviteleri Arasındaki İlişkinin Tip 2 Obez-Sıçan Modelinde İncelenmesi

Metabolik sendrom (MetS); obezite, hiperinsülinemi, hiperlipidemi, hipertansiyon ile karakterize olan ve kardiyovasküler hastalıklar ile tip-2 diyabet için ciddi risk faktörü oluşturan bir patolojidir. MetS deney modelinde yüksek sükroz içeren diyet ile beslenen sıçanlarda hiperglisemi, hiperlipidemi, insulin direnci, glukoz intoleransı, hipertansiyon ve kalp fonksiyon bozukluğu geliştiği gösterilmiştir. Bu bulgular ışığında çalışmamızda MetS oluşturulmuş sıçanlarda gözlenen kalp fonksiyon bozukluğuna neden olan mekanizmalar ve bu bozukluğun oluşumuna fosfodiesterazların (PDE) olası katkısının incelenmesi hedeflenmiştir.

MetS'un sıçan kalbinde miyofibril kayıplarına, bağ doku ve lipid birikimi ile yapısal değişimlere neden olarak ve Ca^{2+} homeostazından sorumlu olan protein aktivitelerinin bozulmasına yol açarak kontraktıl performansı düşürdüğü bulunmuştur. MetS durumunda kalp dokusunda bazı PDE'lerin (PDE3B, PDE4B ve PDE4D gibi) ifade düzeylerinin ve aktivitelerinin arttığı, bu bulgu ile uyumlu olarak PDE inhibitörlerinin kalp kasılmasını düzenleyen süreçler üzerine gösterdikleri etkilerin, MetS grubunda kontrole göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada, yüksek sükroz ile 16-hafta boyunca beslenen sıçanlarda MetS geliştiği ve bu hayvanların kalbin mekanik fonksiyonunun bozulduğu gösterilmiştir. MetS'da gözlenen kalp fonksiyon bozukluklarına katkı sağlayan süreçlerin arasında, kalbin yapısal değişimleri yanında hücre içi Ca^{2+} homeostazını sağlayan mekanizmaların bozulmasının bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca, kalp dokusunda ölçülen artmış PDE etkinliğinin, bu fonksiyon bozukluğunda rol oynayabileceğini işaret eden bazı önemli ön bulgular sergilenmiştir. Bu çalışma sonuçları ile, henüz tip-2 diyabet ya da obezite gelişmediği halde MetS varlığında kalpte önemli hasarın gelişebileceği gösterilmiş olması açısından klinik uygulamalar için de önemli bir temel ön çalışma olabileceğini işaret etmektedir. Buna ek olarak bu çalışma sonuçları, klinikte PDE inhibitörlerinin kullanımında sistemik insulin direnci ya da MetS durumunun göz önüne alınmasının, olası yan etkilerin kontrol altına alınabilmesi bakımından da önemlidir.

Anahtar sözcükler: Ca^{2+} homeostazı, Kardiyomiyosit , Metabolik sendrom, Ryanodin Reseptörü, SERCA

SUMMARY

Investigation of The Cross Talk Between Intracellular Ion Concentrations And Phosphodiesterase Activities in Type-2 Diabetes Induced Cardiac Dysfunctions

Metabolic syndrome (MetS) is a disease characterized by obesity, hyperinsulinemia, hyperlipidemia, hypertension and an important risk factor for development of type-2 diabetes and cardiovascular diseases. Previous studies reported that hyperglycemia, hyperlipidemia, insulin resistance, hypertension and cardiac dysfunction in high-sucrose diet induced MetS disease model. In light of these data, in this study we attempted to investigate the underlying mechanisms of MetS-induced cardiac dysfunction and the effects of phosphodiesterases (PDEs) on the pathophysiology.

We found that MetS induced cardiac dysfunction through myofibril loss, connective tissue and lipid accumulation in the myocardium and alterations of Ca^{2+} handling protein activities. Cardiac expressions and activities of PDEs increased in MetS and, consistent with these results, the effects of PDE inhibitors on the pathways that control cardiac contraction were higher than those in the control group.

In conclusion, we established that a 16-wk high sucrose feeding protocol, which induced cardiac dysfunction, leads to MetS disease model in rats. We define the components of MetS-induced cardiac dysfunction as follows: structural changes in myocardium, Ca^{2+} dyshomeostasis and increased PDE activity. The most striking result of this study is, in the absence of type-2 diabetes or obesity, MetS induced by a high-sucrose diet was enough to alter cardiac performance in the rats. The presence of insulin resistance or MetS should be taken into account in connection with the clinical use of the PDE inhibitors to avoid their potential side effects.

Key words: Ca^{2+} homeostasis, Cardiomyocyte, Metabolic syndrome, Ryanodine receptor, SERCA

KAYNAKLAR

- AFZAL, F., ARONSEN, J.M., MOLTZAU, L.R., SJAASTAD, I., LEVY, F.O., SKOMEDAL, T., OSNES, J.B., QVIGSTAD, E. (2011). Differential regulation of beta2 -adrenoceptor-mediated inotropic and lusitropic response by PDE3 and PDE4 in failing and non-failing rat cardiac ventricle. *Br J Pharmacol.* **162**(1): 54-71.
- AGUILERA, A.A., DIAZ, G.H., BARCELATA, M.L., GUERRERO, O.A., ROS, R.M. (2004). Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem.* **15**(6): 350-357.
- AHLUWALIA, G., RHOADS, A.R., LULLA, M. (1984). Particulate cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and calmodulin of cardiac muscle. *Int J Biochem.* **16**(5): 483-488.
- AI, X., CURRAN, J.W., SHANNON, T.R., BERS, D.M., POGWIZD, S.M. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure. *Circ Res.* **97**(12): 1314-1322.
- ANDERSSON, D.C., BETZENHAUSER, M.J., REIKEN, S., MELI, A.C., UMANSKAYA, A., XIE, W., SHIOMI, T., ZALK, R., LACAMPAGNE, A., MARKS, A.R. (2011). Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab.* **14**(2): 196-207.
- ARAI, M., MATSUI, H., PERIASAMY, M. (1994). Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res.* **74**(4): 555-564.
- BALDERAS-VILLALOBOS, J., MOLINA-MUNOZ, T., MAILLOUX-SALINAS, P., BRAVO, G., CARVAJAL, K., GOMEZ-VIQUEZ, N.L. (2013). Oxidative stress in cardiomyocytes contributes to decreased SERCA2a activity in rats with metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **305**(9): H1344-1353.
- BANOS, G., MEDINA-CAMPOS, O.N., MALDONADO, P.D., ZAMORA, J., PEREZ, I., PAVON, N., PEDRAZA-CHAVERRI, J. (2005). Activities of antioxidant enzymes in two stages of pathology development in sucrose-fed rats. *Can J Physiol Pharmacol.* **83**(3): 278-286.
- BARNES, P.J. (2003). Theophylline: new perspectives for an old drug. *Am J Respir Crit Care Med.* **167**(6): 813-818.
- BASCIANO, H., FEDERICO, L., ADELI, K. (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond).* **2**(1): 5.
- BEAVO, J.A. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* **75**(4): 725-748.
- BECA, S., AHMAD, F., SHEN, W., LIU, J., MAKARY, S., POLIDOVITCH, N., SUN, J., HOCKMAN, S., CHUNG, Y.W., MOVSESIAN, M., MURPHY, E., MANGANIELLO, V., BACKX, P.H. (2013). Phosphodiesterase type 3A regulates basal myocardial contractility through interacting with sarcoplasmic reticulum calcium ATPase type 2a signaling complexes in mouse heart. *Circ Res.* **112**(2): 289-297.
- BECA, S., HELLI, P.B., SIMPSON, J.A., ZHAO, D., FARMAN, G.P., JONES, P.P., TIAN, X., WILSON, L.S., AHMAD, F., CHEN, S.R., MOVSESIAN, M.A., MANGANIELLO, V., MAURICE, D.H., CONTI, M., BACKX, P.H. (2011). Phosphodiesterase 4D regulates baseline sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release and cardiac contractility, independently of L-type Ca²⁺ current. *Circ Res.* **109**(9): 1024-1030.
- BELKE, D.D., BETUING, S., TUTTLE, M.J., GRAVELEAU, C., YOUNG, M.E., PHAM, M., ZHANG, D., COOKSEY, R.C., MCCLAIN, D.A., LITWIN, S.E., TAEGTMEYER, H., SEVERSON, D., KAHN, C.R., ABEL, E.D. (2002). Insulin

- signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest.* **109**(5): 629-639.
- BERS, D.M. (2000). Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ Res.* **87**(4): 275-281.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**: 248-254.
- BRAY, G.A. (2002). Predicting obesity in adults from childhood and adolescent weight. *Am J Clin Nutr.* **76**(3): 497-498.
- BROWNELL, K.D., FARLEY, T., WILLETT, W.C., POPKIN, B.M., CHALOUPKA, F.J., THOMPSON, J.W., LUDWIG, D.S. (2009). The public health and economic benefits of taxing sugar-sweetened beverages. *N Engl J Med.* **361**(16): 1599-1605.
- BURLEW, B.S., WEBER, K.T. (2000). Connective tissue and the heart. Functional significance and regulatory mechanisms. *Cardiol Clin.* **18**(3): 435-442.
- CARDENAS, G., CARLOS TORRES, J., ZAMORA, J., PEREZ, I., BANOS, G. (2006). Isolated heart function after ischemia and reperfusion in sucrose-fed rats: influence of gender and treatment. *Clin Exp Hypertens.* **28**(2): 85-107.
- CARLISLE MICHEL, J.J., DODGE, K.L., WONG, W., MAYER, N.C., LANGEBERG, L.K., SCOTT, J.D. (2004). PKA-phosphorylation of PDE4D3 facilitates recruitment of the mAKAP signalling complex. *Biochem J.* **381**(Pt 3): 587-592.
- CAROLINE, C., CLIFFORD, K., COHEN, J., INGLIS, S., NAUGHTON, M., PICKERING, S., RICHARDSON, K., SMITH, A., VENABLES, A. (1998). Structuring health care for the future. *Nurs Manag (Harrow).* **5**(3): 23-27.
- CHELU, M.G., DANILA, C.I., GILMAN, C.P., HAMILTON, S.L. (2004). Regulation of ryanodine receptors by FK506 binding proteins. *Trends Cardiovasc Med.* **14**(6): 227-234.
- CHOI, K.M., ZHONG, Y., HOIT, B.D., GRUPP, I.L., HAHN, H., DILLY, K.W., GUATIMOSIM, S., LEDERER, W.J., MATLIB, M.A. (2002). Defective intracellular Ca(2+) signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **283**(4): H1398-1408.
- CONNELLY, K.A., KELLY, D.J., ZHANG, Y., PRIOR, D.L., MARTIN, J., COX, A.J., THAI, K., FENELEY, M.P., TSOPORIS, J., WHITE, K.E., KRUM, H., GILBERT, R.E. (2007). Functional, structural and molecular aspects of diastolic heart failure in the diabetic (mRen-2)27 rat. *Cardiovasc Res.* **76**(2): 280-291.
- CONTI, M., IONA, S., CUOMO, M., SWINNEN, J.V., ODEH, J., SVOBODA, M.E. (1995). Characterization of a hormone-inducible, high affinity adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase from the rat Sertoli cell. *Biochemistry.* **34**(25): 7979-7987.
- CRENDAL, E., WALTHER, G., DUTHEIL, F., COURTEIX, D., LESOURD, B., CHAPIER, R., NAUGHTON, G., VINET, A., OBERT, P. (2014). Left ventricular myocardial dyssynchrony is already present in nondiabetic patients with metabolic syndrome. *Can J Cardiol.* **30**(3): 320-324.
- CROS, C., SALLE, L., WARREN, D.E., SHIELS, H.A., BRETTE, F. (2014). The calcium stored in the sarcoplasmic reticulum acts as a safety mechanism in rainbow trout heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **307**(12): R1493-1501.
- DAS, I., CHAIN, E.B. (1972). An effect of insulin on the adenosine 3':5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase and guanosine 3':5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase activities in the perfused Langendorff and working hearts of normal and diabetic rats. *Biochem J.* **128**(3): 95P-96P.
- DAVIDOFF, A.J., MASON, M.M., DAVIDSON, M.B., CARMODY, M.W., HINTZ, K.K., WOLD, L.E., PODOLIN, D.A., REN, J. (2004). Sucrose-induced cardiomyocyte dysfunction is both preventable and reversible with clinically relevant treatments. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **286**(5): E718-724.

- DAVIDOFF, A.W., BOYDEN, P.A., SCHWARTZ, K., MICHEL, J.B., ZHANG, Y.M., OBAYASHI, M., CRABBE, D., TER KEURS, H.E. (2004). Congestive heart failure after myocardial infarction in the rat: cardiac force and spontaneous sarcomere activity. *Ann N Y Acad Sci.* **1015**: 84-95.
- DE FREITAS, E.V., BRANDAO, A.A., POZZAN, R., MAGALHIES, M.E., CASTIER, M., BRANDAO, A.P. (2008). Study of the intima-media thickening in carotid arteries of healthy elderly with high blood pressure and elderly with high blood pressure and dyslipidemia. *Clin Interv Aging.* **3**(3): 525-534.
- DEMIRAL, Y., SOYSAL, A., CAN BILGIN, A., KILIC, B., UNAL, B., UCKU, R., THEORELL, T. (2006). The association of job strain with coronary heart disease and metabolic syndrome in municipal workers in Turkey. *J Occup Health.* **48**(5): 332-338.
- DHINGRA, R., SULLIVAN, L., JACQUES, P.F., WANG, T.J., FOX, C.S., MEIGS, J.B., D'AGOSTINO, R.B., GAZIANO, J.M., VASAN, R.S. (2007). Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. *Circulation.* **116**(5): 480-488.
- DIMEGLIO, D.P., MATTES, R.D. (2000). Liquid versus solid carbohydrate: effects on food intake and body weight. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **24**(6): 794-800.
- DINCER, U.D., ARAIZA, A., KNUDSON, J.D., SHAO, C.H., BIDASEE, K.R., TUNE, J.D. (2006). Dysfunction of cardiac ryanodine receptors in the metabolic syndrome. *J Mol Cell Cardiol.* **41**(1): 108-114.
- DINCER, U.D., ARAIZA, A.G., KNUDSON, J.D., MOLINA, P.E., TUNE, J.D. (2006). Sensitization of coronary alpha-adrenoceptor vasoconstriction in the prediabetic metabolic syndrome. *Microcirculation.* **13**(7): 587-595.
- DUTTA, K., PODOLIN, D.A., DAVIDSON, M.B., DAVIDOFF, A.J. (2001). Cardiomyocyte dysfunction in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. *Diabetes.* **50**(5): 1186-1192.
- ECKEL, R.H., GRUNDY, S.M., ZIMMET, P.Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet.* **365**(9468): 1415-1428.
- EDES, I., KISS, E., KITADA, Y., POWERS, F.M., PAPP, J.G., KRANIAS, E.G., SOLARO, R.J. (1995). Effects of Levosimendan, a cardiotonic agent targeted to troponin C, on cardiac function and on phosphorylation and Ca²⁺ sensitivity of cardiac myofibrils and sarcoplasmic reticulum in guinea pig heart. *Circ Res.* **77**(1): 107-113.
- ELLIOTT, E.B., HASUMI, H., OTANI, N., MATSUDA, T., MATSUDA, R., KANEKO, N., SMITH, G.L., LOUGHREY, C.M. (2011). K201 (JTV-519) alters the spatiotemporal properties of diastolic Ca²⁺ release and the associated diastolic contraction during beta-adrenergic stimulation in rat ventricular cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol.* **106**(6): 1009-1022.
- ENDO, M., TANAKA, M., OGAWA, Y. (1970). Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature.* **228**(5266): 34-36.
- FABIATO, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* **245**(1): C1-14.
- FANG, Z.Y., SCHULL-MEADE, R., DOWNEY, M., PRINS, J., MARWICK, T.H. (2005). Determinants of subclinical diabetic heart disease. *Diabetologia.* **48**(2): 394-402.
- FRANCIS, S.H., BLOUNT, M.A., CORBIN, J.D. (2011). Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev.* **91**(2): 651-690.
- FUJINO, K., SPERELAKIS, N., SOLARO, R.J. (1988). Sensitization of dog and guinea pig heart myofilaments to Ca²⁺ activation and the inotropic effect of pimobendan: comparison with milrinone. *Circ Res.* **63**(5): 911-922.

- FUNG, T.T., MALIK, V., REXRODE, K.M., MANSON, J.E., WILLETT, W.C., HU, F.B. (2009). Sweetened beverage consumption and risk of coronary heart disease in women. *Am J Clin Nutr.* **89**(4): 1037-1042.
- GADDAM, K.K., VENTURA, H.O., LAVIE, C.J. (2011). Metabolic syndrome and heart failure--the risk, paradox, and treatment. *Curr Hypertens Rep.* **13**(2): 142-148.
- GONSOLIN, D., COUTURIER, K., GARAIT, B., RONDEL, S., NOVEL-CHATE, V., PELTIER, S., FAURE, P., GACHON, P., BOIRIE, Y., KERIEL, C., FAVIER, R., PEPE, S., DEMAISON, L., LEVERVE, X. (2007). High dietary sucrose triggers hyperinsulinemia, increases myocardial beta-oxidation, reduces glycolytic flux and delays post-ischemic contractile recovery. *Mol Cell Biochem.* **295**(1-2): 217-228.
- GRASSI, G., QUARTI-TREVANO, F., SERAVALLE, G., DELL'ORO, R. (2007). Cardiovascular risk and adrenergic overdrive in the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* **17**(6): 473-481.
- GRUNDY, S.M. (2004). Metabolic syndrome: part I. *Endocrinol Metab Clin North Am.* **33**(2): ix-xi.
- GUNDOGAN, K., BAYRAM, F., CAPAK, M., TANRIVERDI, F., KARAMAN, A., OZTURK, A., ALTUNBAS, H., GOKCE, C., KALKAN, A., YAZICI, C. (2009). Prevalence of metabolic syndrome in the Mediterranean region of Turkey: evaluation of hypertension, diabetes mellitus, obesity, and dyslipidemia. *Metab Syndr Relat Disord.* **7**(5): 427-434.
- HAIN, J., ONOUE, H., MAYRLEITNER, M., FLEISCHER, S., SCHINDLER, H. (1995). Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J Biol Chem.* **270**(5): 2074-2081.
- HANSON, R.L., IMPERATORE, G., BENNETT, P.H., KNOWLER, W.C. (2002). Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes. *Diabetes.* **51**(10): 3120-3127.
- HARND AHL, L., WIERUP, N., ENERBACK, S., MULDER, H., MANGANIELLO, V.C., SUNDLER, F., DEGERMAN, E., AHREN, B., HOLST, L.S. (2004). Beta-cell-targeted overexpression of phosphodiesterase 3B in mice causes impaired insulin secretion, glucose intolerance, and deranged islet morphology. *J Biol Chem.* **279**(15): 15214-15222.
- HATTORI, Y., MATSUDA, N., KIMURA, J., ISHITANI, T., TAMADA, A., GANDO, S., KEMMOTSU, O., KANNO, M. (2000). Diminished function and expression of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger in diabetic rats: implication in Ca²⁺ overload. *J Physiol.* **527 Pt 1**: 85-94.
- HEERKENS, Y.F., WOITTIEZ, R.D., KIELA, J., HUIJING, P.A., HUSON, A., VAN INGEN SCHENAU, G.J., ROZENDAL, R.H. (1987). Mechanical properties of passive rat muscle during sinusoidal stretching. *Pflugers Arch.* **409**(4-5): 438-447.
- HOLMBERG, S.R., WILLIAMS, A.J. (1991). Phosphodiesterase inhibitors and the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium release channel: differential effects of milrinone and enoximone. *Cardiovasc Res.* **25**(7): 537-545.
- HORTON, T.J., GAYLES, E.C., PRACH, P.A., KOPPENHAFFER, T.A., PAGLIASSOTTI, M.J. (1997). Female rats do not develop sucrose-induced insulin resistance. *Am J Physiol.* **272**(5 Pt 2): R1571-1576.
- HU, P., ZHANG, D., SWENSON, L., CHAKRABARTI, G., ABEL, E.D., LITWIN, S.E. (2003). Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **285**(3): H1261-1269.
- ILKUN, O., BOUDINA, S. (2013). Cardiac dysfunction and oxidative stress in the metabolic syndrome: an update on antioxidant therapies. *Curr Pharm Des.* **19**(27): 4806-4817.
- INGELSSON, E., LANGENBERG, C., HIVERT, M.F., PROKOPENKO, I., LYSSENKO, V., DUPUIS, J., MAGI, R., SHARP, S., JACKSON, A.U., ASSIMES, T.L., SHRADER, P., KNOWLES, J.W., ZETHELIUS, B., ABBASI, F.A., BERGMAN,

- R.N., BERGMANN, A., BERNE, C., BOEHNKE, M., BONNYCASTLE, L.L., BORNSTEIN, S.R., BUCHANAN, T.A., BUMPSTEAD, S.J., BOTTCHEER, Y., CHINES, P., COLLINS, F.S., COOPER, C.C., DENNISON, E.M., ERDOS, M.R., FERRANNINI, E., FOX, C.S., GRAESSLER, J., HAO, K., ISOMAA, B., JAMESON, K.A., KOVACS, P., KUUSISTO, J., LAAKSO, M., LADENVALL, C., MOHLKE, K.L., MORKEN, M.A., NARISU, N., NATHAN, D.M., PASCOE, L., PAYNE, F., PETRIE, J.R., SAYER, A.A., SCHWARZ, P.E., SCOTT, L.J., STRINGHAM, H.M., STUMVOLL, M., SWIFT, A.J., SYVANEN, A.C., TUOMI, T., TUOMILEHTO, J., TONJES, A., VALLE, T.T., WILLIAMS, G.H., LIND, L., BARROSO, I., QUERTERMOUS, T., WALKER, M., WAREHAM, N.J., MEIGS, J.B., MCCARTHY, M.I., GROOP, L., WATANABE, R.M., FLOREZ, J.C., INVESTIGATORS, M. (2010). Detailed physiologic characterization reveals diverse mechanisms for novel genetic Loci regulating glucose and insulin metabolism in humans. *Diabetes*. **59**(5): 1266-1275.
- INUI, M., SAITO, A., FLEISCHER, S. (1987). Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. *J Biol Chem*. **262**(32): 15637-15642.
- JALIL, J.E., DOERING, C.W., JANICKI, J.S., PICK, R., SHROFF, S.G., WEBER, K.T. (1989). Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res*. **64**(6): 1041-1050.
- JUREVICIUS, J., SKEBERDIS, V.A., FISCHMEISTER, R. (2003). Role of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in cAMP compartmentation following beta2-adrenergic stimulation of ICa,L in frog ventricular myocytes. *J Physiol*. **551**(Pt 1): 239-252.
- KAJIMOTO, K., HAGIWARA, N., KASANUKI, H., HOSODA, S. (1997). Contribution of phosphodiesterase isozymes to the regulation of the L-type calcium current in human cardiac myocytes. *Br J Pharmacol*. **121**(8): 1549-1556.
- KAWANO, K., HIRASHIMA, T., MORI, S., NATORI, T. (1994). OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) rat: a new NIDDM rat strain. *Diabetes Res Clin Pract*. **24 Suppl**: S317-320.
- KIM, H.W., CH, Y.S., LEE, H.R., PARK, S.Y., KIM, Y.H. (2001). Diabetic alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and phospholamban protein expression. *Life Sci*. **70**(4): 367-379.
- KITAMURA, T., KITAMURA, Y., KURODA, S., HINO, Y., ANDO, M., KOTANI, K., KONISHI, H., MATSUZAKI, H., KIKKAWA, U., OGAWA, W., KASUGA, M. (1999). Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol*. **19**(9): 6286-6296.
- KUSTER, G.M., LANCEL, S., ZHANG, J., COMMUNAL, C., TRUCILLO, M.P., LIM, C.C., PFISTER, O., WEINBERG, E.O., COHEN, R.A., LIAO, R., SIWIK, D.A., COLUCCI, W.S. (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.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**(5259): 680-685.
- LAI, F.A., ERICKSON, H.P., ROUSSEAU, E., LIU, Q.Y., MEISSNER, G. (1988). Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature*. **331**(6154): 315-319.
- LANCASTER, M.K., COOK, S.J. (1997). The effects of levosimendan on [Ca²⁺]_i in guinea-pig isolated ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol*. **339**(1): 97-100.
- LEHNART, S.E., LEDERER, W.J. (2010). An antidote for calcium leak: targeting molecular arrhythmia mechanisms. *J Mol Cell Cardiol*. **48**(2): 279-282.

- LEHNART, S.E., WEHRENS, X.H., REIKEN, S., WARRIER, S., BELEVYCH, A.E., HARVEY, R.D., RICHTER, W., JIN, S.L., CONTI, M., MARKS, A.R. (2005). Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell*. **123**(1): 25-35.
- LEROY, J., RICHTER, W., MIKA, D., CASTRO, L.R., ABI-GERGES, A., XIE, M., SCHEITRUM, C., LEFEBVRE, F., SCHITTL, J., MATEO, P., WESTENBROEK, R., CATTERALL, W.A., CHARPENTIER, F., CONTI, M., FISCHMEISTER, R., VANDECASTEELE, G. (2011). Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type $\text{Ca}(2+)$ channel complex regulates $\text{Ca}(2+)$ current and protects against ventricular arrhythmias in mice. *J Clin Invest*. **121**(7): 2651-2661.
- LI, L., LIAO, G., YANG, G., LU, Y., DU, X., LIU, J., LI, L., WANG, C., LI, L., REN, Y., ZHONG, Z., CHENG, J., CHEN, Y. (2015). High-fat diet combined with low-dose streptozotocin injections induces metabolic syndrome in *Macaca mulatta*. *Endocrine*.
- LI, S.Y., GOLDEN, K.L., JIANG, Y., WANG, G.J., PRIVRATSKY, J.R., ZHANG, X., EASON, A.R., CULVER, B., REN, J. (2005). Inhibition of sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase differentially regulates contractile function in cardiac myocytes from normotensive and spontaneously hypertensive rats: role of Ca^{2+} regulatory proteins. *Cell Biochem Biophys*. **42**(1): 1-12.
- LOTEN, E.G., SNEYD, J.G. (1970). An effect of insulin on adipose-tissue adenosine 3':5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase. *Biochem J*. **120**(1): 187-193.
- LUGNIER, C. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther*. **109**(3): 366-398.
- LUGNIER, C., MULLER, B., LE BEC, A., BEAUDRY, C., ROUSSEAU, E. (1993). Characterization of indolidan- and rolipram-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterases in canine and human cardiac microsomal fractions. *J Pharmacol Exp Ther*. **265**(3): 1142-1151.
- MALECOT, C.O., ARLOCK, P., KATZUNG, B.G. (1985). Amrinone effects on electromechanical coupling and depolarization-induced automaticity in ventricular muscle of guinea pigs and ferrets. *J Pharmacol Exp Ther*. **232**(1): 10-19.
- MALECOT, C.O., BERS, D.M., KATZUNG, B.G. (1986). Biphasic contractions induced by milrinone at low temperature in ferret ventricular muscle: role of the sarcoplasmic reticulum and transmembrane calcium influx. *Circ Res*. **59**(2): 151-162.
- MALIK, S., WONG, N.D., FRANKLIN, S.S., KAMATH, T.V., L'ITALIEN, G.J., PIO, J.R., WILLIAMS, G.R. (2004). Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation*. **110**(10): 1245-1250.
- MALIK, V.S., POPKIN, B.M., BRAY, G.A., DESPRES, J.P., WILLETT, W.C., HU, F.B. (2010). Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care*. **33**(11): 2477-2483.
- MALTSEV, A.V., YANIV, Y., STERN, M.D., LAKATTA, E.G., MALTSEV, V.A. (2013). RyR-NCX-SERCA local cross-talk ensures pacemaker cell function at rest and during the fight-or-flight reflex. *Circ Res*. **113**(10): e94-e100.
- MANGANIELLO, V.C., MURATA, T., TAIRA, M., BELFRAGE, P., DEGERMAN, E. (1995). Diversity in cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme families. *Arch Biochem Biophys*. **322**(1): 1-13.
- MANGANIELLO, V.C., TAIRA, M., DEGERMAN, E., BELFRAGE, P. (1995). Type III cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE3 gene family). *Cell Signal*. **7**(5): 445-455.
- MARCANTONI, A., CARABELLI, V., VANDAELE, D.H., COMUNANZA, V., CARBONE, E. (2009). PDE type-4 inhibition increases L-type $\text{Ca}(2+)$ currents, action potential firing, and quantal size of exocytosis in mouse chromaffin cells. *Pflugers Arch*. **457**(5): 1093-1110.

- MARX, S.O., REIKEN, S., HISAMATSU, Y., JAYARAMAN, T., BURKHOFF, D., ROSEMBLIT, N., MARKS, A.R. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*. **101**(4): 365-376.
- MATSUI, K., KIYOSUE, T., WANG, J.C., DOHI, K., ARITA, M. (1999). Effects of pimobendan on the L-type Ca^{2+} current and developed tension in guinea-pig ventricular myocytes and papillary muscle: comparison with IBMX, milrinone, and cilostazol. *Cardiovasc Drugs Ther*. **13**(2): 105-113.
- MAURICE, D.H., KE, H., AHMAD, F., WANG, Y., CHUNG, J., MANGANIELLO, V.C. (2014). Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov*. **13**(4): 290-314.
- MAURICE, D.H., PALMER, D., TILLEY, D.G., DUNKERLEY, H.A., NETHERTON, S.J., RAYMOND, D.R., ELBATARNY, H.S., JIMMO, S.L. (2003). Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol Pharmacol*. **64**(3): 533-546.
- MCGARRY, S.J., WILLIAMS, A.J. (1994). Activation of the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channel by analogues of sulmazole. *Br J Pharmacol*. **111**(4): 1212-1220.
- MCQUEEN, A.P., ZHANG, D., HU, P., SWENSON, L., YANG, Y., ZAHA, V.G., HOFFMAN, J.L., YUN, U.J., CHAKRABARTI, G., WANG, Z., ALBERTINE, K.H., ABEL, E.D., LITWIN, S.E. (2005). Contractile dysfunction in hypertrophied hearts with deficient insulin receptor signaling: possible role of reduced capillary density. *J Mol Cell Cardiol*. **39**(6): 882-892.
- MEIGS, J.B., NATHAN, D.M., D'AGOSTINO, R.B., SR., WILSON, P.W., FRAMINGHAM OFFSPRING, S. (2002). Fasting and postchallenge glycemia and cardiovascular disease risk: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care*. **25**(10): 1845-1850.
- MELLOR, K.M., WENDT, I.R., RITCHIE, R.H., DELBRIDGE, L.M. (2012). Fructose diet treatment in mice induces fundamental disturbance of cardiomyocyte Ca^{2+} handling and myofilament responsiveness. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **302**(4): H964-972.
- MIKA, D., BOBIN, P., POMERANCE, M., LECHENE, P., WESTENBROEK, R.E., CATTERALL, W.A., VANDECASTEELE, G., LEROY, J., FISCHMEISTER, R. (2013). Differential regulation of cardiac excitation-contraction coupling by cAMP phosphodiesterase subtypes. *Cardiovasc Res*. **100**(2): 336-346.
- MIKA, D., LEROY, J., VANDECASTEELE, G., FISCHMEISTER, R. (2012). [Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in the cAMP compartmentation in cardiac cells]. *Biol Aujourd'hui*. **206**(1): 11-24.
- MIKLOS, Z., KEMECSEI, P., BIRO, T., MARINCSAK, R., TOTH, B.I., OP DEN BUIJS, J., BENIS, E., DROZGYIK, A., IVANICS, T. (2012). Early cardiac dysfunction is rescued by upregulation of SERCA2a pump activity in a rat model of metabolic syndrome. *Acta Physiol (Oxf)*. **205**(3): 381-393.
- MOHLER, P.J., WEHRENS, X.H. (2007). Mechanisms of human arrhythmia syndromes: abnormal cardiac macromolecular interactions. *Physiology (Bethesda)*. **22**: 342-350.
- MOKNI, W., KERAVIDIS, T., ETIENNE-SELLOUM, N., WALTER, A., KANE, M.O., SCHINI-KERTH, V.B., LUGNIER, C. (2010). Concerted regulation of cGMP and cAMP phosphodiesterases in early cardiac hypertrophy induced by angiotensin II. *PLoS One*. **5**(12): e14227.
- MOLINA, C.E., LEROY, J., RICHTER, W., XIE, M., SCHEITRUM, C., LEE, I.O., MAACK, C., RUCKER-MARTIN, C., DONZEAU-GOUGE, P., VERDE, I., LLACH, A., HOVE-MADSEN, L., CONTI, M., VANDECASTEELE, G., FISCHMEISTER, R. (2012). Cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase type 4 protects against atrial arrhythmias. *J Am Coll Cardiol*. **59**(24): 2182-2190.

- MORGAN, J.P., GWATHMEY, J.K., DEFEO, T.T., MORGAN, K.G. (1986). The effects of amrinone and related drugs on intracellular calcium in isolated mammalian cardiac and vascular smooth muscle. *Circulation*. **73**(3 Pt 2): III65-77.
- MULLER, B., STOCLET, J.C., LUGNIER, C. (1992). Cytosolic and membrane-bound cyclic nucleotide phosphodiesterases from guinea pig cardiac ventricles. *Eur J Pharmacol*. **225**(3): 263-272.
- NAGAOKA, T., SHIRAKAWA, T., BALON, T.W., RUSSELL, J.C., FUJITA-YAMAGUCHI, Y. (1998). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 expression in vivo: evidence for tissue-specific expression of phosphodiesterase 3A or 3B mRNA and activity in the aorta and adipose tissue of atherosclerosis-prone insulin-resistant rats. *Diabetes*. **47**(7): 1135-1144.
- NAGAOKA, T., SHIRAKAWA, T., KASUYA, J., BALON, T.W., MANGANIELLO, V.C., FUJITA-YAMAGUCHI, Y. (1998). Cyclic nucleotide PDE-3. Quantitation of PDE-3A and -3B mRNAs in rat tissues by RNase protection assay. *Cell Biochem Biophys*. **29**(1-2): 49-66.
- NAKAGAWA, T., HU, H., ZHARIKOV, S., TUTTLE, K.R., SHORT, R.A., GLUSHAKOVA, O., OUYANG, X., FEIG, D.I., BLOCK, E.R., HERRERA-ACOSTA, J., PATEL, J.M., JOHNSON, R.J. (2006). A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*. **290**(3): F625-631.
- NAKAI, J., IMAGAWA, T., HAKAMAT, Y., SHIGEKAWA, M., TAKESHIMA, H., NUMA, S. (1990). Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. *FEBS Lett*. **271**(1-2): 169-177.
- NETTICADAN, T., TEMSAH, R.M., KENT, A., ELIMBAN, V., DHALLA, N.S. (2001). Depressed levels of Ca²⁺-cycling proteins may underlie sarcoplasmic reticulum dysfunction in the diabetic heart. *Diabetes*. **50**(9): 2133-2138.
- NEVELSTEEN, I., BITO, V., VAN DER MIEREN, G., VANDERPER, A., VAN DEN BERGH, A., SIPIDO, K.R., MUBAGWA, K., HERIJGERS, P. (2013). ACE-inhibition, but not weight reduction restores cardiomyocyte response to beta-adrenergic stimulation in the metabolic syndrome. *BMC Cardiovasc Disord*. **13**: 51.
- NIELSEN, S.J., SIEGA-RIZ, A.M., POPKIN, B.M. (2002). Trends in energy intake in U.S. between 1977 and 1996: similar shifts seen across age groups. *Obes Res*. **10**(5): 370-378.
- NIKOLIC, S., YELLIN, E.L., TAMURA, K., VETTER, H., TAMURA, T., MEISNER, J.S., FRATER, R.W. (1988). Passive properties of canine left ventricle: diastolic stiffness and restoring forces. *Circ Res*. **62**(6): 1210-1222.
- NUNES, S., SOARES, E., FERNANDES, J., VIANA, S., CARVALHO, E., PEREIRA, F.C., REIS, F. (2013). Early cardiac changes in a rat model of prediabetes: brain natriuretic peptide overexpression seems to be the best marker. *Cardiovasc Diabetol*. **12**: 44.
- OKRUHLICOVA, L., TRIBULOVA, N., ECKLY, A., LUGNIER, C., SLEZAK, J. (1996). Cytochemical distribution of cyclic AMP-dependent 3',5'-nucleotide phosphodiesterase in the rat myocardium. *Histochem J*. **28**(3): 165-172.
- OLSON, E.M., KIM, D., SMITH, T.W., MARSH, J.D. (1987). Mechanism of the positive inotropic effect of milrinone in cultured embryonic chick ventricular cells. *J Mol Cell Cardiol*. **19**(1): 95-104.
- ONAT, A. (2002). On the coronary heart disease mortality in Turkey. *Atherosclerosis*. **163**(1): 203-204.
- ONAT, A., YUKSEL, M., KOROGLU, B., GUMRUKCUOGLU, H.A., AYDIN, M., CAKMAK, H.A., KARAGOZ, A., CAN, G. (2013). [Turkish Adult Risk Factor Study survey 2012: overall and coronary mortality and trends in the prevalence of metabolic syndrome]. *Turk Kardiyol Dern Ars*. **41**(5): 373-378.

- OTSU, K., WILLARD, H.F., KHANNA, V.K., ZORZATO, F., GREEN, N.M., MACLENNAN, D.H. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* **265**(23): 13472-13483.
- PANCHAL, S.K., POUDYAL, H., IYER, A., NAZER, R., ALAM, A., DIWAN, V., KAUTER, K., SERNIA, C., CAMPBELL, F., WARD, L., GOBE, G., FENNING, A., BROWN, L. (2011). High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* **57**(1): 51-64.
- PANG, P.S., CLELAND, J.G., TEERLINK, J.R., COLLINS, S.P., LINDSELL, C.J., SOPKO, G., PEACOCK, W.F., FONAROW, G.C., ALDEEN, A.Z., KIRK, J.D., STORROW, A.B., TAVARES, M., MEBAZAA, A., ROLAND, E., MASSIE, B.M., MAISEL, A.S., KOMAJDA, M., FILIPPATOS, G., GHEORGHIAD, M., ACUTE HEART FAILURE SYNDROMES INTERNATIONAL WORKING, G. (2008). A proposal to standardize dyspnoea measurement in clinical trials of acute heart failure syndromes: the need for a uniform approach. *Eur Heart J.* **29**(6): 816-824.
- PARKER, J.C., VANVOLKENBURG, M.A., KETCHUM, R.J., BRAYMAN, K.L., ANDREWS, K.M. (1995). Cyclic AMP phosphodiesterases of human and rat islets of Langerhans: contributions of types III and IV to the modulation of insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* **217**(3): 916-923.
- PERCHENET, L., HINDE, A.K., PATEL, K.C., HANCOX, J.C., LEVI, A.J. (2000). Stimulation of Na/Ca exchange by the beta-adrenergic/protein kinase A pathway in guinea-pig ventricular myocytes at 37 degrees C. *Pflugers Arch.* **439**(6): 822-828.
- PEREIRA, L., MATTHES, J., SCHUSTER, I., VALDIVIA, H.H., HERZIG, S., RICHARD, S., GOMEZ, A.M. (2006). Mechanisms of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient decrease in cardiomyopathy of db/db type 2 diabetic mice. *Diabetes.* **55**(3): 608-615.
- PEREZ-TORRES, I., EL HAFIDI, M., INFANTE, O., BANOS, G. (2008). Effects of sex hormone levels on aortic vascular reactivity and variables associated with the metabolic syndrome in sucrose-fed female rats. *Can J Physiol Pharmacol.* **86**(1-2): 25-35.
- PERRICONE, N.V., BAGCHI, D., ECHARD, B., PREUSS, H.G. (2008). Blood pressure lowering effects of niacin-bound chromium(III) (NBC) in sucrose-fed rats: renin-angiotensin system. *J Inorg Biochem.* **102**(7): 1541-1548.
- PIESKE, B., MAIER, L.S., BERS, D.M., HASENFUSS, G. (1999). Ca^{2+} handling and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res.* **85**(1): 38-46.
- POGWIZD, S.M., QI, M., YUAN, W., SAMAREL, A.M., BERS, D.M. (1999). Upregulation of $\text{Na}(+)/\text{Ca}(2+)$ exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circ Res.* **85**(11): 1009-1019.
- POLOTSKY, V.Y. (2007). Mouse model of the metabolic syndrome: the quest continues. *J Appl Physiol (1985).* **102**(6): 2088-2089.
- PORTHA, B., LACRAZ, G., CHAVEY, A., FIGEAC, F., FRADET, M., TOUREL-CUZIN, C., HOMO-DELARCHE, F., GIROIX, M.H., BAILBE, D., GANGNERAU, M.N., MOVASSAT, J. (2010). Islet structure and function in the GK rat. *Adv Exp Med Biol.* **654**: 479-500.
- RABABA'H, A., CRAFT, J.W., JR., WIJAYA, C.S., ATROOZ, F., FAN, Q., SINGH, S., GUILLORY, A.N., KATSONIS, P., LICHTARGE, O., MCCONNELL, B.K. (2013). Protein kinase A and phosphodiesterase-4D3 binding to coding polymorphisms of cardiac muscle anchoring protein (mAKAP). *J Mol Biol.* **425**(18): 3277-3288.
- REAVEN, G.M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* **37**(12): 1595-1607.

- REGAN, T.J., WU, C.F., YEH, C.K., OLDEWURTEL, H.A., HAIDER, B. (1981). Myocardial composition and function in diabetes. The effects of chronic insulin use. *Circ Res.* **49**(6): 1268-1277.
- REISER, S., BOHN, E., HALLFRISCH, J., MICHAELIS, O.E.T., KEENEY, M., PRATHER, E.S. (1981). Serum insulin and glucose in hyperinsulinemic subjects fed three different levels of sucrose. *Am J Clin Nutr.* **34**(11): 2348-2358.
- RIOS, E., BRUM, G. (2002). Ca^{2+} release flux underlying Ca^{2+} transients and Ca^{2+} sparks in skeletal muscle. *Front Biosci.* **7**: d1195-1211.
- 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. *Pharmacol Res.* **37**(3): 233-240.
- ROBBEZ MASSON, V., LUCAS, A., GUEUGNEAU, A.M., MACAIRE, J.P., PAUL, J.L., GRYNBERG, A., ROUSSEAU, D. (2008). Long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids prevent metabolic and vascular disorders in fructose-fed rats. *J Nutr.* **138**(10): 1915-1922.
- RUEHR, M.L., RUSSELL, M.A., FERGUSON, D.G., BHAT, M., MA, J., DAMRON, D.S., SCOTT, J.D., BOND, M. (2003). Targeting of protein kinase A by muscle A kinase-anchoring protein (mAKAP) regulates phosphorylation and function of the skeletal muscle ryanodine receptor. *J Biol Chem.* **278**(27): 24831-24836.
- SAKATA, S., LEBECHE, D., SAKATA, Y., SAKATA, N., CHEMALY, E.R., LIANG, L., NAKAJIMA-TAKENAKA, C., TSUJI, T., KONISHI, N., DEL MONTE, F., HAJJAR, R.J., TAKAKI, M. (2007). Transcoronary gene transfer of SERCA2a increases coronary blood flow and decreases cardiomyocyte size in a type 2 diabetic rat model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **292**(2): H1204-1207.
- SANTIAGO, D.J., RIOS, E., SHANNON, T.R. (2013). Isoproterenol increases the fraction of spark-dependent RyR-mediated leak in ventricular myocytes. *Biophys J.* **104**(5): 976-985.
- SANTURE, M., PITRE, M., MARETTE, A., DESHAIES, Y., LEMIEUX, C., LARIVIERE, R., NADEAU, A., BACHELARD, H. (2002). Induction of insulin resistance by high-sucrose feeding does not raise mean arterial blood pressure but impairs haemodynamic responses to insulin in rats. *Br J Pharmacol.* **137**(2): 185-196.
- SCHULZE, M.B., MANSON, J.E., LUDWIG, D.S., COLDITZ, G.A., STAMPFER, M.J., WILLETT, W.C., HU, F.B. (2004). Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *JAMA.* **292**(8): 927-934.
- SCHWANKE, M.L., DUTTA, K., PODOLIN, D.A., DAVIDOFF, A.J. (2006). Cardiomyocyte dysfunction in insulin-resistant rats: a female advantage. *Diabetologia.* **49**(5): 1097-1105.
- SELENSCIG, D., ROSSI, A., CHICCO, A., LOMBARDO, Y.B. (2010). Increased leptin storage with altered leptin secretion from adipocytes of rats with sucrose-induced dyslipidemia and insulin resistance: effect of dietary fish oil. *Metabolism.* **59**(6): 787-795.
- SENA, S., HU, P., ZHANG, D., WANG, X., WAYMENT, B., OLSEN, C., AVELAR, E., ABEL, E.D., LITWIN, S.E. (2009). Impaired insulin signaling accelerates cardiac mitochondrial dysfunction after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* **46**(6): 910-918.
- SENFT, G., SCHULTZ, G., MUNSKE, K., HOFFMANN, M. (1968). Effects of glucocorticoids and insulin on 3',5'-AMP phosphodiesterase activity in adrenalectomized rats. *Diabetologia.* **4**(6): 330-335.
- SHAFRIR, E., ZIV, E. (2009). A useful list of spontaneously arising animal models of obesity and diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **296**(6): E1450-1452.

- SHANNON, T.R., POGWIZD, S.M., BERS, D.M. (2003). Elevated sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in intact ventricular myocytes from rabbits in heart failure. *Circ Res.* **93**(7): 592-594.
- SHARMA, K., MCCUE, P., DUNN, S.R. (2003). Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am J Physiol Renal Physiol.* **284**(6): F1138-1144.
- SHKRYL, V.M., BLATTER, L.A., RIOS, E. (2012). Properties of Ca^{2+} sparks revealed by four-dimensional confocal imaging of cardiac muscle. *J Gen Physiol.* **139**(3): 189-207.
- SHPILBERG, Y., BEAUDRY, J.L., D'SOUZA, A., CAMPBELL, J.E., PECKETT, A., RIDDELL, M.C. (2012). A rodent model of rapid-onset diabetes induced by glucocorticoids and high-fat feeding. *Dis Model Mech.* **5**(5): 671-680.
- SILVA, A.P., GUIMARAES, D.E., MIZURINI, D.M., MAIA, I.C., ORTIZ-COSTA, S., SARDINHA, F.L., DO CARMO, M.G. (2006). Dietary fatty acids early in life affect lipid metabolism and adiposity in young rats. *Lipids.* **41**(6): 535-541.
- SOYSAL, A., DEMIRAL, Y., SOYSAL, D., UCKU, R., KOSEOGU, M., AKSAKOGLU, G. (2005). The prevalence of metabolic syndrome among young adults in Izmir, Turkey. *Anadolu Kardiyol Derg.* **5**(3): 196-201.
- SUMIYOSHI, M., SAKANAKA, M., KIMURA, Y. (2006). Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. *J Nutr.* **136**(3): 582-587.
- SZCZEPANIAK, L.S., DOBBINS, R.L., METZGER, G.J., SARTONI-D'AMBROSIA, G., ARBIQUE, D., VONGPATANASIN, W., UNGER, R., VICTOR, R.G. (2003). Myocardial triglycerides and systolic function in humans: in vivo evaluation by localized proton spectroscopy and cardiac imaging. *Magn Reson Med.* **49**(3): 417-423.
- TADIC, M., IVANOVIC, B., CELIC, V., KOCABAY, G. (2014). The impact of metabolic syndrome, recently diagnosed diabetes and hypertension on right ventricular remodeling. Is there difference between risk factors? *Clin Exp Hypertens.* **36**(5): 295-301.
- TAKIZAWA, T., ARAI, M., YOGUCHI, A., TOMARU, K., KURABAYASHI, M., NAGAI, R. (1999). Transcription of the SERCA2 gene is decreased in pressure-overloaded hearts: A study using in vivo direct gene transfer into living myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* **31**(12): 2167-2174.
- THIEDEMANN, K.U., HOLUBARSCH, C., MEDUGORAC, I., JACOB, R. (1983). Connective tissue content and myocardial stiffness in pressure overload hypertrophy. A combined study of morphologic, morphometric, biochemical, and mechanical parameters. *Basic Res Cardiol.* **78**(2): 140-155.
- VASANJI, Z., CANTOR, E.J., JURIC, D., MOYEN, M., NETTICADAN, T. (2006). Alterations in cardiac contractile performance and sarcoplasmic reticulum function in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. *Am J Physiol Cell Physiol.* **291**(4): C772-780.
- VENETUCCI, L.A., TRAFFORD, A.W., EISNER, D.A. (2007). Increasing ryanodine receptor open probability alone does not produce arrhythmogenic calcium waves: threshold sarcoplasmic reticulum calcium content is required. *Circ Res.* **100**(1): 105-111.
- VERDE, I., PAHLKE, G., SALANOVA, M., ZHANG, G., WANG, S., COLETTI, D., ONUFFER, J., JIN, S.L., CONTI, M. (2001). Myomegalin is a novel protein of the golgi/centrosome that interacts with a cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J Biol Chem.* **276**(14): 11189-11198.
- VERDE, I., VANDECASTEELE, G., LEZOUALC'H, F., FISCHMEISTER, R. (1999). Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes. *Br J Pharmacol.* **127**(1): 65-74.

- VINOGRADOVA, T.M., SIRENKO, S., LYASHKOV, A.E., YOUNES, A., LI, Y., ZHU, W., YANG, D., RUKNUDIN, A.M., SPURGEON, H., LAKATTA, E.G. (2008). Constitutive phosphodiesterase activity restricts spontaneous beating rate of cardiac pacemaker cells by suppressing local Ca^{2+} releases. *Circ Res.* **102**(7): 761-769.
- WEHRENS, X.H., LEHNART, S.E., REIKEN, S., VEST, J.A., WRONSKA, A., MARKS, A.R. (2006). Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(3): 511-518.
- WEHRENS, X.H., LEHNART, S.E., REIKEN, S.R., MARKS, A.R. (2004). Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res.* **94**(6): e61-70.
- WENINGER, S., DE MAEYER, J.H., LEFEBVRE, R.A. (2013). Influence of phosphodiesterases and cGMP on cAMP generation and on phosphorylation of phospholamban and troponin I by 5-HT₄ receptor activation in porcine left atrium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **386**(8): 671-684.
- WIJKANDER, J., LANDSTROM, T.R., MANGANIELLO, V., BELFRAGE, P., DEGERMAN, E. (1998). Insulin-induced phosphorylation and activation of phosphodiesterase 3B in rat adipocytes: possible role for protein kinase B but not mitogen-activated protein kinase or p70 S6 kinase. *Endocrinology.* **139**(1): 219-227.
- WUSSLING, M.H., SALZ, H. (1996). Nonlinear propagation of spherical calcium waves in rat cardiac myocytes. *Biophys J.* **70**(3): 1144-1153.
- XIAO, B., SUTHERLAND, C., WALSH, M.P., CHEN, S.R. (2004). Protein kinase A phosphorylation at serine-2808 of the cardiac Ca^{2+} -release channel (ryanodine receptor) does not dissociate 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6). *Circ Res.* **94**(4): 487-495.
- YANO, M., KOBAYASHI, S., KOHNO, M., DOI, M., TOKUHISA, T., OKUDA, S., SUETSUGU, M., HISAOKA, T., OBAYASHI, M., OHKUSA, T., KOHNO, M., MATSUZAKI, M. (2003). FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure. *Circulation.* **107**(3): 477-484.
- YANO, M., KOHNO, M., OHKUSA, T., MOCHIZUKI, M., YAMADA, J., KOHNO, M., HISAOKA, T., ONO, K., TANIGAWA, T., KOBAYASHI, S., MATSUZAKI, M. (2000). Effect of milrinone on left ventricular relaxation and Ca^{2+} uptake function of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **279**(4): H1898-1905.
- YAO, L., CHEN, G.P., LU, X., ZHENG, L.R., MOU, Y., HU, S.J. (2009). Effects of atorvastatin on calcium-regulating proteins: a possible mechanism to repair cardiac dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Basic Res Cardiol.* **104**(3): 258-268.
- YARAS, N., UGUR, M., OZDEMIR, S., GURDAL, H., PURALI, N., LACAMPAGNE, A., VASSORT, G., TURAN, B. (2005). Effects of diabetes on ryanodine receptor Ca^{2+} release channel (RyR2) and Ca^{2+} homeostasis in rat heart. *Diabetes.* **54**(11): 3082-3088.
- ZACCOLO, M., MOVSESIAN, M.A. (2007). cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ Res.* **100**(11): 1569-1578.
- ZHANG, R., MARATOS-FLIER, E., FLIER, J.S. (2009). Reduced adiposity and high-fat diet-induced adipose inflammation in mice deficient for phosphodiesterase 4B. *Endocrinology.* **150**(7): 3076-3082.
- ZHU, H., SUK, H.Y., YU, R.Y., BRANCHO, D., OLABISI, O., YANG, T.T., YANG, X., ZHANG, J., MOUSSAIF, M., DURAND, J.L., JELICKS, L.A., KIM, J.Y., SCHERER, P.E., FRANK, P.G., LISANTI, M.P., CALVERT, J.W., DURANSKI, M.R., LEFER, D.J., HUSTON, E., BAILLIE, G.S., HOUSLAY, M.D., MOKKENTIN, J.D., JIN, J., CHOW, C.W. (2010). Evolutionarily conserved role of

calcineurin in phosphodegron-dependent degradation of phosphodiesterase 4D. *Mol Cell Biol.* **30**(18): 4379-4390.

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı: Esmâ Nur

Soyadı: Okatan

Doğum yeri ve tarihi: Ankara, 25.12.1984

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Medeni durumu: Evli

İletişim adresi ve telefonu: zeydanli@ankara.edu.tr, 0534-4553669

II-Eğitimi

Doktora Programı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.B.D

Yüksek Lisans Programı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.B.D.

Lisans Programı, Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

III-Ünvanları

Araştırma Görevlisi

Bilim Uzmanı

Biyolog

IV-Mesleki Deneyimi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.B.D.; Araştırma Görevlisi (2009-)

Tübitak SBAG 111S042 numaralı proje; Bursiyer

Tübitak SBAG 107S427 numaralı proje; Bursiyer

Gülhane Askeri Tıp Akademisi; Stajyer (Mikrobiyoloji, Hematoloji ve Kanser Araştırma Laboratuvarlarında)

V. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

•Türk Biyofizik Derneği •Türk Biyokimya Derneği •Biophysical Society

VI. Bilimsel İlgi Alanları

Okatan EN, Kizil S, Gokturk H, Can B, Turan B. High-carbohydrate diet-induced myocardial remodelling in rats. Curr Res Cardiol Vol 2 No 1 Spring 2015

Tuncay E, **Okatan EN**, Toy A, Turan B. Enhancement of cellular antioxidant-defence preserves diastolic dysfunction via regulation of both diastolic Zn^{2+} and Ca^{2+} and prevention of RyR2-leak in hyperglycemic cardiomyocytes. Oxid Med Cell Longev. 2014;2014:290381.

Okatan EN, Tuncay E, Turan B. Cardioprotective effect of selenium via modulation of cardiac ryanodine receptor calcium release channels in diabetic rat cardiomyocytes through thioredoxin system. J Nutr Biochem. 2013 Dec;24(12):2110-8. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.08.002.

Ozcinar E, **Okatan EN**, Tuncay E, Eryilmaz S, Turan B. Improvement of functional recovery of donor heart following cold static storage with doxycycline cardioplegia. Cardiovasc Toxicol. 2014 Mar;14(1):64-73. doi:10.1007/s12012-013-9231-1.

Tuncay E, **Okatan EN**, Vassort G, Turan B. β -blocker timolol prevents arrhythmogenic Ca^{2+} release and normalizes Ca^{2+} and Zn^{2+} dyshomeostasis in hyperglycemic rat heart. PLoS One. 2013 Jul 29;8(7):e71014. doi:10.1371/journal.pone.0071014.

Tuncay E, **Zeydanli EN**, Turan B. Cardioprotective effect of propranolol on diabetes-induced altered intracellular Ca^{2+} signaling in rat. *J Bioenerg Biomembr*. 2011 Dec;43(6):747-56. Epub 2011 Nov 30.

Zeydanli EN, Kandilci HB, Turan B. Doxycycline ameliorates vascular endothelial and contractile dysfunction in the thoracic aorta of diabetic rats. *Cardiovasc Toxicol*. 2011 Jun;11(2):134-47. doi: 10.1007/s12012-011-9107-1.

Kandilci HB, Tuncay E, **Zeydanli EN**, Sozmen NN, Turan B. Age-related regulation of excitation-contraction coupling in rat heart. *J Physiol Biochem*. 2011 Feb 2.

Tuncay E, Bilginoglu A, Sozmen NN, **Zeydanli EN**, Ugur M, Vassort G, Turan B. Intracellular free zinc during cardiac excitation-contraction cycle: calcium and redox dependencies. *Cardiovasc Res*. 2011 Feb 15;89(3):634-42.

Zeydanli EN, Turan B. Omega-3E treatment regulates matrix metalloproteinases and prevents vascular reactivity alterations in diabetic rat aorta. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009 Dec;87(12):1063-73.

Zeydanli EN, Bilginoglu A, Tanriverdi E, Gurdal H, Turan B. Selenium restores defective beta-adrenergic receptor response of thoracic aorta in diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 2010 May;338(1-2):191-201.

Bilginoglu A, Seymen A, Tuncay E, **Zeydanli E**, Aydemir-Koksoy A, Turan B. Antioxidants but not doxycycline treatments restore depressed beta-adrenergic responses of the heart in diabetic rats. *Cardiovasc Toxicol*. 2009 Mar;9(1):21-9.

Esma Zeydanli, Belma Turan. Antioxidant Treatments Improve Diabetes Induced Endothelium-Dependent Vascular Dysfunction. *Erciyes Tıp Dergisi*. 2009, Cilt 31, Sayı 3, Sayfa(lar) 193-200.

VII. Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar;

Bilimsel Toplantılara Aktif Katılım Desteği (A. Ü. Bilimsel Etkinlikleri ve Yayınları Özendirme Desteği; Kanada, Rusya, ABD, İtalya ve Almanya)

10. Uluslararası Biyofizik Yaz Okulu' na katılım bursu (UNESCO; Hırvatistan)

Baltic Yaz Okulu' na katılım bursu (Marie Curie Programı; Danimarka ve Almanya)

XXVIII ISHR Avrupa Toplantısı'na katılım bursu (International Society for Heart Research; İtalya)

Tübitak Proje Bursiyeri (Tübitak SBAG 107S427, 111S042 numaralı projeler)

Yüksek Lisans Bursu (Tübitak)

Aldığı ödüller;

IV FESTEM Sempozyumunda poster sunum ödülü

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi kapsamında üçüncülükle mezuniyet ödülü

Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümünden birincilikle mezuniyet ödülü

Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümüne birincilikle giriş ödülü

Projeleri;

Matriks metalloproteinazların diyabetik sıçanların endotel bağımlı damar gevşemelerindeki rolü (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.B.D. Yüksek Lisans Tez Projesi)

Nikel Sülfatın ARH-77 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi (Gülhane Askeri Tıp Akademisi Kanser Araştırma Laboratuvarı ve Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarları Lisans Bitirme Projesi)

Katıldığı Bilimsel Toplantı ve Kurslar;

International Academy of Cardiovascular Sciences Avrupa Toplantısı (Balatongyörök, Macaristan); Poster Sunumu; 2014

Fikri ve Sinai Mülkiyet Hakları, Ulusal ve Uluslararası Uygulamalar Kursu

(Ankara Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi); 2014

EMBL Advanced Course on Imaging Techniques (Heidelberg, Almanya); Poster Sunumu; 2013

Türk Biyokimya Derneği Seminer Günü (ODTÜ); 2013

25. Ulusal Biyofizik Kongresi (KATÜ); Poster Sunumu; 2013

Sağlık Bilimlerinde Mikrogenetleyici (Arduino) Kullanımı Kursu (25. Ulusal Biyofizik Kongresi, KATÜ); 2013

EMBO Genç Bilim Adamları Forumu (Yeditepe Üniversitesi); 2012

Gordon Research Konferansları (Lucca, İtalya); Poster Sunumu; 2012

24. Ulusal Biyofizik Kongresi (Marmara Üniversitesi); Poster Sunumu; 2012

Çalıştay, “Molecular Approaches to Obesity and Diabetes with New Implications” (ODTÜ); 2012

23. Ulusal Biyofizik Kongresi (Trakya Üniversitesi); Poster Sunumu; 2011

Experimental Biology Toplantısı (Washington DC, ABD); Poster Sunumu; 2011

International Symposium on New Approaches in Cardiovascular Disorders (Ankara); 2011

IV FESTEM Sempozyumu (St. Petersburg, Rusya); Poster Sunumu; 2010

Moleküler Dinamik Çalıştayı (TOBB Üniversitesi); 2010

2nd Protein Rainbow Workshop. SELDI for Biomarker Research (Düsseldorf, Almanya); 2010

20. Dünya Diyabet Kongresi (Montreal, Kanada); Poster Sunumu; 2009

10. Uluslararası Biyofizik Yaz Okulu (Rovinj, Hırvatistan); Poster Sunumu; 2009

Baltic Yaz Okulu “Genetic Basis of Medicine” (Kiel, Almanya); Poster Sunumu; 2009

3. International Congress of Molecular Medicine (İstanbul); 2009

Baltic Yaz Okulu (Kopenhag, Danimarka); Poster Sunumu; 2008

XXVIII ISHR Avrupa Toplantısı (Atina, Yunanistan); Poster Sunumu; 2008

Ankara Tıp Biyokimya Günü (Ankara); 2008

NATO Advanced Research Workshop (İstanbul); 2008

Ulusal Farmakoloji Toplantısı (Karadeniz Teknik Üniversitesi); Poster Sunumu; 2007

Slovak Fizyoloji ve Avrupa Fizyoloji Derneklerinin Toplantısı (Bratislava, Slovakia); Poster Sunumu; 2007

ISHR Dünya Kongresi (Bologna, İtalya); Poster Sunumu; 2006

“Selenium in Health and Disease” başlıklı sempozyum (Ankara); 2006