



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**VALSARTAN/SAKUBİTRİL KOMBİNASYONU
LCZ696’NIN DİABETİK KARDİYAK
DİSFONKSİYON ÜZERİNE OLASI ETKİLERİNİN
BETA ADRENERJİK YANITVERİRLİK
ÜZERİNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Betül Rabia ERDOĞAN

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Ebru ARIOĞLU İNAN**

ANKARA

2020

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VALSARTAN/SAKUBİTRİL KOMBİNASYONU
LCZ696’NİN DİABETİK KARDİYAK
DİSFONKSİYON ÜZERİNE OLASI ETKİLERİNİN
BETA ADRENERJİK YANITVERİRLİK
ÜZERİNDEN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Betül Rabia ERDOĞAN

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ebru ARIOĞLU İNAN

**Bu tez TÜBİTAK’ın 117S936 ve 115S564 numaralı projeleri ile
desteklenmiştir.**

ANKARA

2020

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Valsartan/Sakubitril kombinasyonu LCZ696’nın diabetik kardiyak disfonksiyon üzerine olası etkilerinin beta adrenerjik yanıtverirlik üzerinden değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Betül Rabia ERDOĞAN

Tarih: 18/08/2020

İmza:

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Diabetes Mellitus	1
1.1.1. Diabetes Mellitusun Sınıflandırılması	2
1.1.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus	2
1.1.1.2. Tip 2 Diabetes Mellitus	3
1.1.1.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus	4
1.1.1.4. Diğer Nedenlere Bağlı Olmayan Spesifik Diabetes Mellitus Tipleri	5
1.1.2. Diabetin Kardiyak Fonksiyon Üzerine Etkileri	5
1.1.3. Diabette Kalp Yetmezliği Tedavisi	8
1.2. Beta Adrenerjik Reseptörler	9
1.2.1. Kalpte Bulunan Beta Adrenerjik Reseptör Alt Tipleri ve Sinyal Mekanizmaları	10
1.2.2. Diabetin Kardiyak Beta Adrenerjik Reseptörler Üzerine Etkisi	14
1.3. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi (RAAS)	16
1.4. Natriüretik Peptidler	18
1.5. Neprilisin (NEP) Enzimi	21
1.6. LCZ696 (Valsartan/sakubitril): Kalp Yetmezliğinde Yeni Tedavi Yaklaşımı	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1 Kullanılan Gereçler	30
2.1.1. Cihazlar	30
2.1.2. Kimyasal Malzemeler	32
2.2. Kullanılan Yöntemler	34
2.2.1. Deney Hayvanları	34
2.2.2. Diabetin Oluşturulması	35
2.2.3. LCZ696 ve Valsartan Tedavisi	35
2.2.4. Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT)	35
2.2.5. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçülmesi	36
2.2.6. İn vivo Kalp Deneyleri	36
2.2.6.1. İn vivo Kateterizasyon Deneyi	36
2.2.6.2. İn vivo Ekokardiyografi Deneyi	37
2.2.7. İn vitro Kalp Deneyleri	37
2.2.7.1. İn vitro İzole Papiller Kas Deneyi	37
2.2.7.2. İn vitro Langendorff Kalp Preparasyonu Deneyi	38
2.2.8. Western Blot Deneyleri	39
2.2.9. İstatistiksel Analiz	43
2.2.10. Yazım ve Grafiklerin Oluşturulması	43

3. BULGULAR	45
3.1. Deney Hayvanlarının Genel Özellikleri	45
3.1.1. Ölüm Anı Beden Ağırlığı, Kalp Ağırlığı, Kan Şekeri Düzeyi	45
3.1.2. OGTT Kan Şekeri Düzeyleri ve Açlık Plazma İnsülin Düzeyi ile HOMA-IR Değerleri	46
3.1.3. Plazma Total Kolesterol ve Trigliserid Düzeyleri	48
3.1.4. Plazma NT-proBNP Düzeyleri	49
3.2. İn vivo Kardiyak Ölçümler	49
3.2.1. İn vivo Kateterizasyon Sonuçları	49
3.2.2. İn vivo Ekokardiyografi Sonuçları	54
3.3. İn vitro Kalp Deneyleri	57
3.3.1. Langendorff Kalp Preparasyonu Deneyi	57
3.3.1.1. CL 316,243 Yanıtları	57
3.3.2. İzole Papiller Kas Deneyi	58
3.3.2.1. İzoprenalin Yanıtları	58
3.3.2.2. Forskolin Yanıtları	58
3.4. Western Blot Deneyleri	59
3.4.1. SERCA2a, Fosfolamban ve Fosforile Fosfolamban İfadelenme Düzeyi	59
4. TARTIŞMA	61
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
ÖZET	70
SUMMARY	71
KAYNAKLAR	72
EKLER	90
Ek 1. Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onay Raporu	90
ÖZGEÇMİŞ	91

ÖNSÖZ

Diabet, dünya genelinde halihazırda 460 milyondan fazla insanı etkileyen ve görülme sıklığı her geçen gün artan kronik, metabolik bir hastalıktır. Diabete bağlı ortaya çıkan morbidite ve mortalitenin en önemli nedeni kardiyovasküler komplikasyonlardır. Diabette, glisemik kontrolü sağlayan ilaçların yanı sıra, kardiyak disfonksiyonu önleyici ve/veya tedavi edici ilaçların geliştirilmesi büyük öneme sahiptir. Diabet patofizyolojisinde beta adrenerjik yanıtverirlik, diabette kardiyak disfonksiyon gelişmesine neden olan önemli etkenlerden biridir. LCZ696, bir anjiyotensin reseptör blokeri olan valsartan ile bir neprilisin inhibitörü olan sakubitrilin 1:1 kombinasyonudur. Bu ilaç, 2015 yılında düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliğinin tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır. Yapılan prelinik çalışmalarda ilacın diabetik kalpte olumlu etkileri gösterilmiştir. İlacın bu olumlu etkilerini hangi mekanizmayla gösterdiği ise tam olarak açıklanamamıştır ve konuyla ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bu noktadan hareketle, diabetik kalpte olumlu etkileri olduğu gösterilen LCZ696'nın diabette bozulan kardiyak beta adrenerjik yanıtverirlik üzerine etkisi ilacın içeriğinde bulunan valsartanla karşılaştırmalı olarak ilk defa çalışmamızda incelenmiştir.

TÜBİTAK tarafından desteklenen bu çalışma Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

Doktora eğitimime başladığım ilk andan itibaren akademik anlamda ve hayatın her alanında bana yol gösteren ve destek veren; bilgi birikimine, deneyimine her zaman saygı duyduğum, güvendiğim ve örnek aldığım bir bilim insanı olan danışmanım, değerli hocam Doç. Dr. Ebru Arıoğlu İnan'a,

Lisans eğitimimde anlattığı derslerle Farmakoloji alanını seçmemde büyük etkisi olan, akademik ve entelektüel bilgi birikimine hayran olduğum saygıdeğer hocam Prof. Dr. V. Melih Altan'a,

Bilimsel anlamda yeni bir bakış açısı kazanmamı sağlayan ve akademik kariyerim konusunda desteğini her zaman hissettiğim saygıdeğer hocam Prof. Dr. Martin C. Michel'e,

Tez çalışmalarımı değerlendiren, hem akademik hem de hayatın her alanında desteğini bana hep hissettiren saygıdeğer hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Arzu Beşikci'ye,

Tez çalışmalarımı başlangıcından itibaren değerlendiren ve değerli görüşlerini benimle paylaşan sayın hocam Prof. Dr. Mustafa Ark'a,

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini her zaman benimle paylaşan ve desteklerini hiç esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. A. Tanju Özçelikay, Doç. Dr. Işıl Özakça Gündüz ve Dr. Gizem Kaykı Mutlu'ya,

Doktora eğitimim boyunca desteklerini ve güler yüzlerini esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Gülgün Ozansoy, Prof. Dr. Nuray Arı ve Prof. Dr. Serap Gür'e,

Çalışmalarım boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, zorlu deney süreçlerini kolaylaştıran, hem iş hayatında hem de sosyal hayatta varlıklarıyla beni mutlu eden çok değerli ve sevgili çalışma arkadaşlarım Uzm. Ecz. A. Elif Müderrisoğlu, Ecz. İrem Karaömerlioğlu ve Ecz. Z. Elif Yeşilyurt'a,

Çalışmalarıma katılan Vet. Kadir Sevim ve çalışmalarına destek olan Vet. Yasin Şenel'e,

İhtiyaç duyduğum her an yanımda olan sevgili arkadaşlarım Dr. Berna Güven, Ecz. Zümra Kara, Dr. Didem Yılmaz Oral ve Ecz. Heba Asker'e,

Öğrencilik sürecim boyunca tüm evrak işlerimin eksiksiz ve hızlı bir şekilde yürütülmesini sağlayan, anabilim dalımız eski sekreteri sayın Fatma Cerepoğlu'na,

Tez çalışmalarım boyunca hayvan bakımı konusunda bana destek olan ve yardımını esirgemeyen sayın İsmail Başer'e,

Tüm başarılarımı borçlu olduğum, beni her kararında sonuna kadar destekleyen, bana güvenen ve bugünlere gelmemi sağlayan canım anneme, babama ve biricik kardeşime,

Tez çalışmasında kullanılan valsartan/sakubitril ve valsartan bileşiklerini tarafımıza ücretsiz olarak verdikleri için Novartis firmasına,

Doktora eğitim sürecinde 6 ay boyunca yurtdışında çalışma yapmam için destek sağlayan Ankara Üniversitesi AB Eğitim Programları Koordinatörlüğü'ne ve Erasmus+ Programına,

Doktora süreci boyunca sağladıkları burs (2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı) ve proje desteği (SBAG-117S936 ve SBAG-115S564) sebebiyle TÜBİTAK'a,

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

SİMGELER VE KISALTMALAR

2D	İki boyutlu
α	Alfa
ACE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ACEi	Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü
AGE	İleri glikasyon son ürün
AH	Atım hacmi
AHI	Atım hacmi indeksi
Akt	Protein kinaz B
AMPK	5'-adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz
Ang	Anjiyotensin
ANP	Atrial natriüretik peptid
APS	Amonyum persülfat
AR	Adrenerjik reseptör
ARB	Anjiyotensin reseptör blokeri
ARNi	Anjiyotensin reseptör blokeri-neprilisin inhibitörü
AS	Adenilil siklaz
AT1R	Anjiyotensin tip 1 reseptörü
AT2R	Anjiyotensin tip 2 reseptörü
β	Beta
BCA	Bikinkoninik asit
BNP	B-tipi natriüretik peptid
BSA	Bovine serum albumin
Ca ⁺⁺	Kalsiyum
CaMKII	Ca ⁺⁺ /Kalmodulin kinaz II
cAMP	Siklik adenozin 3',5'-monofosfat
cGMP	Siklik guanozin 3',5'-monofosfat
CHARM	<i>The Candesartan in Heart Failure—Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity Program</i>
CNP	C-tipi natriüretik peptid
DDP-4	Dipeptidil peptidaz-4

DKB	Diyastolik kan basıncı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNP	Dendroaspis natriüretik peptid
dP/dtmax	Kasılma hızı
dP/dtmin	Gevşeme hızı
DREAM	<i>The Diabetes Reduction Assessment with Ramipril and Rosiglitazone Medication</i>
DSB	Diyastol sonu basınç
DSH	Diyastol sonu hacmi
DSHI	Diyastol sonu hacim indeksi
DTT	Dithiothreitol
ECL	Artırılmış kemilüminesans
EDPVR	Diyastol sonu basınç hacim ilişkisi
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
EF	Ejeksiyon fraksiyonu
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
Emax	Efikasite
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
ER	Endoplazmik retikulum
ESPVR	Sistol sonu basınç hacim ilişkisi
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FS	Fraksiyonel kısalma
γ	Gama
GDP	Guanozin difosfat
GLP-1	Glukagon benzeri peptid-1
GPCR	G-protein-kenetli reseptör
GS	Guanilil siklaz
GTP	Guanozin trifosfat
HbA1c	Glikolize hemoglobin
HCl	Hidroklorik asit
HFpEF	Ejeksiyon fraksiyonu korunmuş kalp yetmezliği
HFrEF	Düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği

HOMA-IR	<i>Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance</i>
HOPE	<i>The Heart Outcomes Prevention Evaluation</i>
IVSd	Diyastolde interventriküler septumun kalınlığı
IVSId	Diyastolde interventriküler septumun kalınlığı indeksi
IVSIs	Sistolde interventriküler septumun kalınlığı indeksi
IVSs	Sistolde interventriküler septumun kalınlığı
i.p	İntraperitoneal
KAH	Kalp atım hızı
Kcal	Kilokalori
KD	Kardiyak debi
KI	Kardiyak indeks
LVEDP	Sol ventrikül diyastol sonu basıncı
LVIDd	Diyastolde sol ventrikül iç çapı
LVIDId	Diyastolde sol ventrikül iç çapı indeksi
LVIDIs	Sistolde sol ventrikül iç çapı indeksi
LVIDs	Sistolde sol ventrikül iç çapı
LVPWd	Diyastolde sol ventrikülün arka duvar kalınlığı
LVPWId	Diyastolde sol ventrikülün arka duvar kalınlığı indeksi
LVPWIs	Sistolde sol ventrikülün arka duvar kalınlığı indeksi
LVPWs	Sistolde sol ventrikülün arka duvar kalınlığı
MAPK	Mitojenle-aktive olan protein kinaz
MI	Miyokard infarktüsü
MICRO HOPE	<i>The Microalbuminuria, Cardiovascular, and Renal Outcomes HOPE</i>
Na ⁺	Sodyum
Na ₂ VO ₃	Sodyum ortovanadat
NEP	Neprilisin
NEPi	Neprilisin inhibitörü
NO	Nitrik oksit
NP	Natriüretik peptid
NPR	Natriüretik peptid reseptör
NS	Nitroselüloz

NT-proBNP	proBNP ₁₋₁₀₈ 'nin amino terminal fragmanı
OGTT	Oral glukoz tolerans testi
OKB	Ortalama kan basıncı
OVERTURE	<i>The Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events</i>
PARADIGM-HF	<i>Prospective Comparison of ARNI with ACEI to Determine Impact on Global Mortality ve Morbidity in Heart Failure</i>
PARAMOUNT	<i>Prospective comparison of ARNI with ARB on Management of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction</i>
PDE-II	Fosfodiesteraz-II
PI3K	Fosfotidilinositol-3-kinaz
PKA	Protein kinaz A
PKG	Protein kinaz G
PLN	Fosfolamban
p-PLN	Fosforile fosfolamban
PRSW	Ard yük bağımsız atım gücü
PTX	Pertussis toksin
PV	Basınç-hacim
PVDF	Polivinilidin florür
RAAS	Renin-anjiotensin-aldosteron sistemi
RIPA	Radyoimmünopresipitasyon tampon çözeltisi
RyR2	Ryanodin reseptörü
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SERCA2a	SR Ca ⁺⁺ ATPaz
SGLT-2	Sodyum glukoz ko-transporter-2
SKB	Sistolik kan basıncı
SR	Sarkoplazmik retikulum
SD	Standart sapma
SSB	Sistol sonu basınç
SSH	Sistol sonu hacmi
SSHI	Sistol sonu hacim indeksi
SSS	Sempatik sinir sistemi

STZ	Streptozotosin
SVGB	Sol ventrikül içi gelişen basınç
Tau	İzovolumik gevşeme sabiti
TBS	Trisle tamponlanmış salin
TEMED	Tetrametiletildiamin
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü- β
TGS	Tris/Glisin/SDS
USD	Amerikan doları
V	Volt
VALUE	<i>The Valsartan Antihypertensive Long-term Use Evaluation</i>
ZDF	<i>Zucker diabetic fatty</i>

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Diabetik kardiyomiyopatinin patofizyolojik mekanizması	7
Şekil 1.2. G protein kenetli reseptör yapısı ve alfa (α) alt biriminin aktivasyonu	10
Şekil 1.3. Kalpte β_1 ve β_2 -AR'lerin hücre içi sinyalizasyon yolları	12
Şekil 1.4. Kalpte β_3 -ARlerin hücre içi sinyalizasyon yolları	13
Şekil 1.5. Natriüretik peptidlerin etki mekanizmaları, etkileri ve metabolizmaları	21
Şekil 1.6. LCZ696'nın molekül yapısı ve etki yerleri	25
Şekil 3.1. Sıçanların genel özellikleri	46
Şekil 3.2. OGTT kan şekeri değerlerinin zamana göre değişimi	47
Şekil 3.3. Sıçanların plazma lipid düzeyleri	48
Şekil 3.4. Sıçanların plazma NT-proBNP düzeyleri	49
Şekil 3.5. Sıçanların karotid arterden ölçülen kan basıncı değerleri	50
Şekil 3.6. <i>İn vivo</i> PV-loop sistolik fonksiyon parametreleri	52
Şekil 3.7. <i>İn vivo</i> PV-loop diyastolik fonksiyon parametreleri	53
Şekil 3.8. <i>İn vivo</i> ekokardiyografi sistolik fonksiyon parametreleri	55
Şekil 3.9. Langendorff kalp preparasyonunda CL316,243 ile elde edilen gevşeme yanıtları	57
Şekil 3.10. Papiller kasta izoprenalinle elde edilen kasılma yanıtları	58
Şekil 3.11. Papiller kasta forskolin ile elde edilen kasılma yanıtları	59
Şekil 3.12. Kalpte gevşeme yolağı ile ilişkili protein ifadenmeleri	60

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Ayırıcı jel formülasyonu	39
Çizelge 2.2. Yükleme jel formülasyonu	40
Çizelge 2.3. Trisin ayırıcı jel formülasyonu	40
Çizelge 2.4. Trisin yükleme jel formülasyonu	41
Çizelge 2.5. Katot tampon çözeltisi formülasyonu	41
Çizelge 2.6. Anot tampon çözeltisi formülasyonu	41
Çizelge 2.7. Transfer tampon çözeltisi formülasyonu	42
Çizelge 2.8. Primer antikorlar ve dilüsyonları	42
Çizelge 2.9. Sekonder antikorlar ve dilüsyonları	43
Çizelge 3.1. Sıçanların OGTT sırasında ölçülen kan şekeri değerleri	47
Çizelge 3.2. Sıçanların OGTT öncesi ölçülen açlık kan şekeri değerleri, açlık insülin düzeyleri ve HOMA-IR indeksi değerleri	48
Çizelge 3.3. <i>In vivo</i> bazal kardiyak hemodinamik parametreler	51
Çizelge 3.4. Ard yük bağımsız <i>in vivo</i> kardiyak parametreler	54
Çizelge 3.5. <i>In vivo</i> ekokardiyografi parametreleri	56

1. GİRİŞ

1.1. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus, pankreasta yeterli miktarda insülin üretilmemesi ve/veya üretilen insülinin dokular tarafında kullanılamaması sonucu ortaya çıkan ve yüksek kan şekeri ile karakterize kronik bir hastalıktır. İnsülin, pankreasta langerhans adacıklarının beta (β) hücrelerinden salgılanan anabolik bir hormondur. İnsülin hormonu sayesinde, kandaki glukoz hücre içine alınarak enerjiye dönüştürülür. İnsülin aynı zamanda protein ve yağ metabolizmasından da sorumlu temel hormondur. İnsülin eksikliği ve/veya hücrede insülin direnci oluşması diabetin klinik belirtisi olan yüksek kan şekeri tablosuna yol açmaktadır (IDF, 2019). Kontrol altına alınamayan yüksek kan şekeri, uzun dönemde ortaya çıkan ve ciddi sağlık sorunları olan kardiyovasküler hastalıklar, retinopati, nefropati, nöropati, serebrovasküler hastalık, obezite, erektil disfonksiyon ve nonalkolik karaciğer yağlanması neden olmaktadır (WHO, 2019).

Uluslararası Diabet Federasyonunun verilerine göre, dünya çapında 2000 yılında 151 milyon olan diabetik birey sayısı (20-79 yaş), 2019 yılında yaklaşık üç kat artarak 463 milyona ulaşmıştır. Bu rakamın 2030 yılında 578 milyon, 2045 yılında ise 700 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (IDF, 2019). Dünya genelinde diabete bağlı sağlık harcamaları yıllık yaklaşık 760 milyar Amerikan Doları (USD) dır. Bu rakamın 2030 yılında 825 USD ve 2045 yılında 845 USD'ye ulaşacağı düşünülmektedir. Diabete bağlı ölümler, tüm dünyada ilk 10 ölüm nedeni arasında yer almaktadır. 2019 yılında diabet ve komplikasyonlarına bağlı olarak 4,2 milyon kişi (20-79 yaş) hayatını kaybetmiştir (IDF, 2019).

Avrupa'da 2019 yılında 59 milyon olan diabetik birey sayısının (20-79 yaş) 2045 yılında 67 milyona ulaşması beklenmektedir. Türkiye, Almanya ve Rusya'nın ardından diabetik birey sayısının (6,6 milyon) en fazla olduğu 3. Avrupa ülkesidir (IDF, 2019). Günümüzde diabetik birey sayısının (20-79 yaş) en yüksek olduğu 10 ülke sıralamasında bulunmayan Türkiye'nin 2045 yılında 10. sıraya yükselmesi

öngörülmektedir. Türkiye’de diabet nedenli sağlık harcamaları, toplam sağlık harcamalarının %23,8’ini oluşturmaktadır (IDF, 2019).

1.1.1. Diabetes Mellitusun Sınıflandırılması

Amerikan Diabet Derneğinin güncel sınıflandırmasına göre diabetes mellitus, tip 1 diabet, tip 2 diabet, gestasyonel diabet, diğer nedenlere bağlı spesifik diabet tipleri olmak üzere dört ana başlık altında toplanmıştır (ADA, 2019).

1.1.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus

Tip 1 diabetes mellitus (insülin bağımlı diabet), pankreasın langerhans adacıklarında bulunan β hücrelerin ciddi oranda ya da tamamen hasarına bağlı olarak insülin eksikliğiyle sonuçlanan diabet tipidir. Tip 1 diabetin, tip 1a ve tip 1b diabet olmak üzere iki alt tipi bulunmaktadır. Tip 1a diabette, β hücrelerin immün sistem aracılı hasarı söz konusu iken, tip 1b diabette β hücre hasarının nedeni bilinmemektedir (Katzung ve Trevor, 2015). Tip 1 diabette insülin eksikliğine bağlı olarak, kandaki glukoz hücrelere alınamaz ve bunun sonucunda kan şekeri yükselir. İnsülin eksikliğinde hücrelere glukoz alınamaması sonucunda, karaciğerde açlık durumunda aktive olan glikojenolizis ve glukoneojenezis yolları uyarılır. Karaciğerde üretilen glukoz kan dolaşımına geçerek hiperglisemi taplosunun kötüleşmesine neden olur (Silverthorn, 2016).

Yüksek kan şekeri, böbrek tübüllerine reabsorbe olabilecek miktardan daha fazla glukoz ulaşmasına neden olur, böylece idrarla atılan glukoz miktarı artar. İdrarla atılan glukoz, ozmotik etki ile sıvı reabsorpsiyonunu da azaltarak ozmotik diüreze neden olur. İdrarla atılan sıvı miktarının artması tip 1 diabetin klasik semptomlarından olan aşırı idrara çıkma (poliüri) ve bunun sonucu olarak artmış su içme isteğine (polidipsi) yol açar. Beyindeki çoğu nöronun aksine, doygunluk merkezindeki nöronlar insülin duyarlıdır ve insülin yokluğunda glukozu kullanamaz. İntraselüler glukoz yokluğu

açlık gibi algılanır ve yeme merkezi daha fazla yiyecek alımı için uyarılır. Bu durum, tip 1 diabetes mellitus'ün üçüncü klasik semptomu olan aşırı yemek yeme (polifaji) tablosunun ortaya çıkmasına neden olur (Silverthorn, 2016). İnsülin eksikliğinde glukozun enerji kaynağı olarak kullanılamaması, protein ve yağların enerji üretiminde kullanımını artırır. Protein ve yağ depolarının boşalması sonucunda eğer bireyin kan şekeri kontrol altına alınamazsa, polifajiye rağmen hızlı kilo kaybı görülür ve birey kendisini yorgun hisseder. İnsülin eksikliğinde enerji üretiminde glukoz yerine yağların kullanılması, dolaşımda keton cisimlerinin miktarının artmasına neden olarak ölümlerle sonuçlanabilen diabetik ketoasidoz tablosuna neden olur (Guyton ve Hall, 2016).

Gelişmiş ülkelerde, diabetik bireylerin % 7-12'si tip 1 diabetes mellitus hastasıdır (IDF, 2017). Dünyada 20 yaşın altında 1,1 milyon tip 1 diabetes mellitus birey bulunmaktadır (IDF, 2019). Tip 1 diabetes mellitus genellikle çocukluk çağlarında ortaya çıkmakla birlikte, tip 1 diabetes mellitus başlangıcı yetişkinlerde de meydana gelebilmektedir. Tip 1 diabetes mellitus hastalarının %84'ünü yetişkinler oluşturmaktadır (WHO, 2019).

1.1.1.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 diabetes mellitus (insülin bağımlı olmayan diabetes), dokularda insüline karşı direnç gelişiminin yanı sıra kısmi insülin eksikliğinin de eşlik ettiği diabetes mellitus tipidir. Tip 1 diabetes mellitus aksine, tip 2 diabetes mellitus artmış plazma insülin konsantrasyonu (hiperinsülinemi) tablosu vardır. Dokularda azalan insülin duyarlılığı sonucunda, pankreas β hücrelerinden kompensatuvar mekanizma olarak insülin salınımı artar (Guyton ve Hall, 2016). Tip 2 diabetes mellitus altında yatan nedenler tam olarak anlaşılamamakla birlikte, yüksek beden ağırlığı, obezite ve yaşlılık tip 2 diabetes mellitus yatkınlığı artırmaktadır. Bu faktörlerin dışında ırk ve aile öyküsü de tip 2 diabetes mellitus yatkınlığı etkilemektedir (IDF, 2019).

Tip 2 diabetes mellitus gözlenen akut semptomlar, tip 1 diabetes mellitus olduğu kadar şiddetli değildir. İnsülin direncine rağmen az miktarda da olsa hücrelere glukoz taşınması ve metabolize edilmesi söz konusudur. Bu nedenle çoğu tip 2 diabetes mellitus hastası, hastalığın

başlangıcında asemptomatiktir. Bu durum tanı konulduktan sonra hem hastalığın tedavisini zorlaştırmakta hem de uzun süre kontrol altına alınmayan kan şekeri, makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların oluşma riskini artırmaktadır (Silverthorn, 2016).

Tip 2 diyabet, genellikle 40 yaş ve üstü bireylerde görülmekle birlikte, kötü beslenme alışkanlığı, obezite ve fiziksel aktivite azlığının giderek artması nedeniyle son yıllarda çocuk ve gençlerde tip 2 diyabet görülme sıklığı artmıştır (IDF, 2019). Dünya genelinde, diyabet vakalarının yaklaşık % 90-95'ini tip 2 diyabetik bireyler oluşturmaktadır (ADA, 2019).

1.1.1.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus

Gestasyonel diabetes mellitus, ilk defa hamilelik sırasında ortaya çıkan hiperglisemi tablosu olarak tanımlanmaktadır. Özellikle gebeliğin son trimesterinde plasental hormonlar insülin rezistansı oluşmasına yol açar (Katzung ve Trevor, 2015). Hamilelik sırasında fazla kilo alımı, fazla kilo ve obezite, ileri yaşlarda hamile kalma, gestasyonel diyabet öyküsü, ailede diyabet öyküsü, polikistik over sendromu, sigara kullanımı, düşük hikayesi gestasyonel diyabet riskini artırmaktadır. Risk faktörü bulunan hamileler, hamileliğin başından itibaren gestasyonel diyabet gelişimi riski açısından izlenmelidir. Gestasyonel diyabet öyküsü olan 40 yaş altı bireylerde, hamileliği izleyen 3-6 yıl sonra tip 2 diyabet gelişme olasılığı yüksektir (IDF, 2019). Gestasyonel diyabet, hamilelikte gözlenen hiperglisemi olgularının % 75-90'ını oluşturmaktadır. 2019 yılında sağlıklı dünyaya gelen bebeklerin %15,8'inin gebelikte yaşanan hiperglisemiden etkilendiği bildirilmiştir. Bu bebekler, yaşam boyu obezite ve tip 2 diyabet gelişimi açısından yüksek risk taşımaktadırlar (IDF, 2019).

1.1.1.4. Diğer Nedenlere Bağlı Olmayan Spesifik Diabetes Mellitus Tipleri

Diğer nedenlere bağlı olmayan spesifik diabet tipleri ise aşağıdaki şekilde sıralanabilir (WHO, 2019):

- Monojenik diabet (β hücre fonksiyonunda meydana gelen monojenik bozukluklar)
- İnsülin aktivitesinde monojenik bozukluklar (klinik sendrom sonucu genlerde meydana gelen mutasyon)
- Diabetle ilişkili olabilecek diğer genetik sendromlar
- Ekzokrin pankreas hastalıkları
- Endokrin hastalıklar
- Enfeksiyonlar (konjenital kızamıkçık, sitomegalovirüs, koksaki B, kabakulak, adenovirüslere bağlı β hücre hasarı)
- İlaç veya kimyasalla indüklenmiş diabet
- Yaygın olmayan immün sistem aracılı diabet

1.1.2. Diabetin Kardiyak Fonksiyon Üzerine Etkileri

Diabet ve diabete bağlı komplikasyonların görülme sıklığı dünya genelinde gün geçtikçe artmaktadır. Diabet ve kardiyovasküler hastalıklar arasındaki ilişki Framingham Heart Study kapsamında yapılan çalışmalarla 1970'li yılların sonunda ortaya konulmuştur (Framingham Heart Study, 26/2/2020). Aterosklerotik kardiyovasküler hastalıklar (koroner kalp hastalığı, serebrovasküler hastalık ya da periferik arter hastalığı) ve kalp yetmezliği diabete bağlı gözlenen morbidite ve mortalitenin başlıca nedenleridir (ADA, 2019). Diabetik bireyler, diabetik olmayanlara oranla kardiyovasküler hastalık görülme açısından 2-3 kat daha fazla risk altındadırlar (IDF, 2017). Diabetik bireylerin %32,2'sinde kardiyovasküler hastalıklar görülmektedir ve kardiyovasküler komplikasyonlar bu bireylerde en sık rastlanan ölüm nedenidir (Einarson ve ark., 2018). Tip 2 diabetik bireylerin yaklaşık %70'i kardiyovasküler hastalıklar nedeniyle hayatını kaybetmektedir (Silverthorn, 2016).

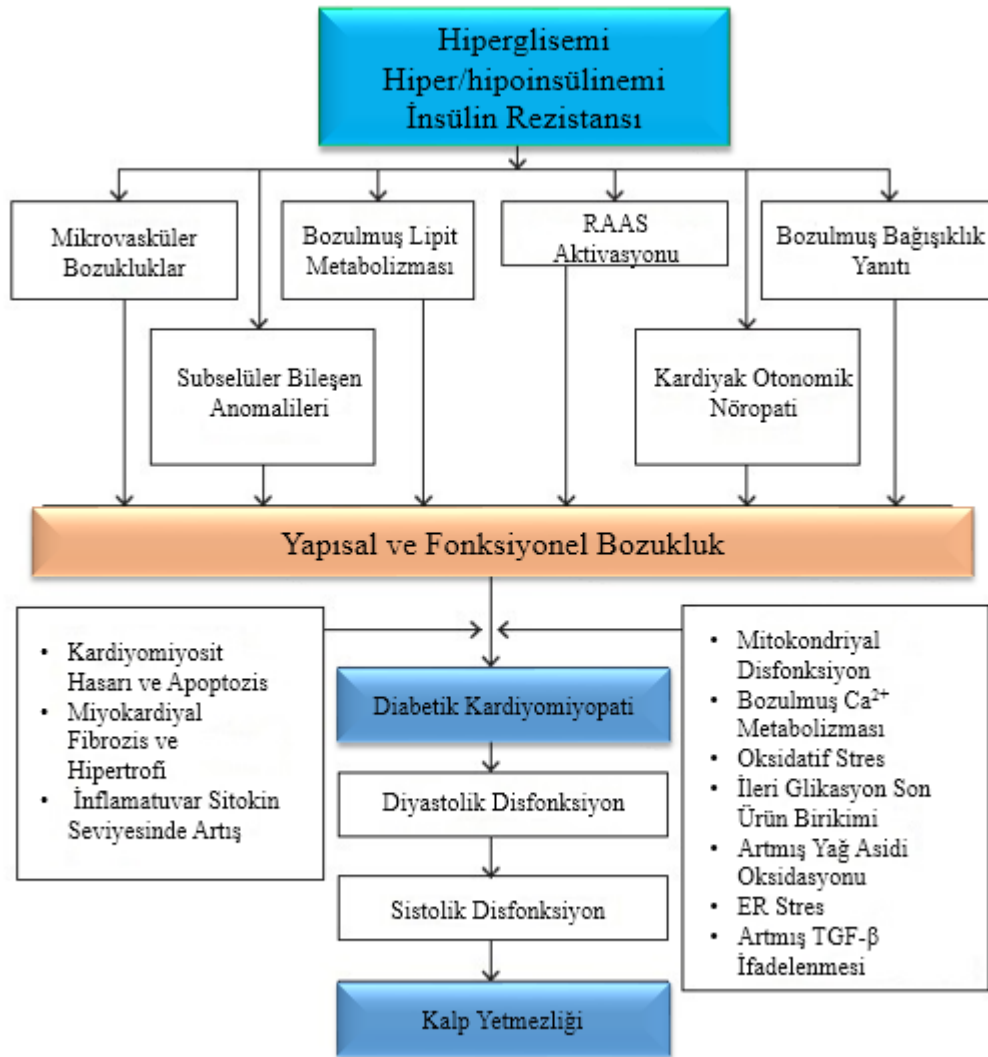
Yapılan alışmalar kalp yetmezliği prevalansının diabetik bireylerde yüksek olduğunu ve hastalık seyrinin, diabetik olmayan bireylerle karşılaştırıldığında diabetik bireylerde daha kötü seyrettiğini göstermektedir (Lehrke ve Marx, 2017).

Diabetik kardiyomiyopati, koroner arter hastalığı, hipertansiyon ve kalp kapağı hastalıkları gibi kardiyovasküler risk faktörlerinden bağımsız olarak meydana gelen kalp kasında yapısal değişiklikler ile karakterize ve buna bağlı kalbin vcoda yeterince kan pompalayamaması ile sonuçlanan bir kalp hastalığıdır (Jia ve ark., 2018). Diabetik kardiyomiyopatide erken dönemde diyastolik disfonksiyon, geç dönemde ise sistolik disfonksiyon gözlenmektedir. Bu klinik tablo ilerleyen dönemde kalp yetmezliğine yol açmaktadır (Palomer ve ark., 2018).

Diabette hiperglisemi, insülin rezistansı ve hiper/hipoinslinemi diabetik kardiyomiyopatinin oluşumuna neden olan birçok mekanizmayı tetiklemektedir. Hiperglisemi, reaktif oksijen radikallerinin ve ileri glikasyon son rn (AGE) birikimini artırmakla birlikte kalsiyum (Ca^{++}) homeostazında bozulmaya ve endoplazmik retikulum (ER) stresinde artışa neden olur. Artan kan glukozu seviyesi sonucunda kan volumünde meydana gelen azalma renin-anjiyotensin-aldosteron sistemini (RAAS) aktive etmektedir. Hiperglisemi, oksidatif stres ve artan AGE birikiminin de etkisiyle mikrovasküler bozuklukları da tetiklemektedir (Sivasankar ve ark., 2018). Azalan insülin duyarlılığı ve/veya seviyesi kalbi enerji kaynağı olarak glukoz yerine serbest yağ asitlerini kullanmaya yönlendirir, bu durum kalbin oksijen gereksinimini artırarak kardiyak strese neden olur. Bunun yanı sıra, insülin duyarlılığında azalma hipertansiyon ve ateroskleroz oluşumuna da aracılık etmektedir (Haas ve McDonnell, 2018). Hiperinsülineminin kardiyak disfonksiyon gelişmesinde bilinen en önemli rolü damarlarda sertleşmeye yol açarak, dolaşım bozukluğuna neden olmasıdır (Jia ve ark., 2016).

Hiperglisemi, insülin rezistansı ve hiper/hipoinslinemi etkisiyle tetiklenen ve kardiyomiyopati oluşumuna neden olan diğer mekanizmalar ise bozulmuş bağışıklık yanıtı, inflamatuvar sitokin seviyesinde artış, mitokondriyal disfonksiyon ve benzeri subselüler bileşen anomalileri ile kardiyak otonomik nöropati ve artmış dönüştürücü

büyüme faktörü- β (TGF- β) ifadenmesidir. Tüm bu mekanizmalar sonucu kardiyomiyositlerde yapısal ve fonksiyonel bozukluk meydana gelmekte, bu durum diyabetik kardiyomiyopati ve ilerleyen dönemde kalp yetmezliğine yol açmaktadır. (Jia ve ark., 2016 ve Lee ve Kim, 2017) (Şekil 1.1). İnsülin, 5'-adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz (AMPK) ve β -adrenerjik reseptör (AR) sinyal iletim mekanizmalarında meydana gelen değişimler de diyabetik kardiyomiyopati oluşumunda rol oynayan faktörlerdendir (Varma ve ark., 2018).



Şekil 1.1. Diyabetik kardiyomiyopatinin patofizyolojik mekanizması

RAAS, renin anjiyotensin aldosteron sistemi; ER, endoplazmik retikulum; TGF- β , dönüştürücü büyüme faktörü- β (Lee ve Kim, 2017)

1.1.3. Diabette Kalp Yetmezliği Tedavisi

Diabette kalp yetmezliği ve diğer kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde egzersiz, diyet gibi kan şekeri düzeyi ve insülin duyarlılığı üzerinde olumlu etkileri bulunan hayat tarzı değişiklikleri önerilmektedir. Ne var ki hayat tarzı değişikliğinin diabetik bireylerde kalp yetmezliği ve diğer kardiyovasküler hastalıkların oluşmasını azalttığını gösteren yeterli çalışma bulunmamaktadır (Marwick ve ark., 2018 ve Henning, 2018). Kan şekeri düzeyinin antidiabetik ilaçlarla kontrol altında tutulması, diabette kalp yetmezliği ve diğer kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde diğer bir yaklaşımdır. Diabette yoğun tedavi yaklaşımı ile kan şekerinin kontrol altında tutulması kardiyovasküler hastalıkların oluşmasını %30'a kadar azaltmaktadır (Research Group DCCT/EDIC, 2016). Glikolize hemoglobin (HbA1c) düzeyinde %1 oranında artış kalp yetmezliği riskini %8 oranında artırırken (Marwick ve ark., 2018), kardiyovasküler hastalık riskini %18 oranında artırmaktadır (Selvin ve ark., 2004). Bununla birlikte HbA1c düzeyinde azalmanın diabete bağlı kardiyovasküler hastalıkların ve bu hastalıklara bağlı ölümlerin önlemesinden anlamlı bir etkisinin olmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Duckworth ve ark., 2009 ve Group UKPDS, 1998). Başka bir çalışmada ise, HbA1c düzeyinde standart tedavi yaklaşımından daha fazla azalmaya neden olan yoğun tedavi yaklaşımı alan hastalarda mortalite oranı %22 daha yüksek bulunmuştur (Gerstein ve ark., 2008a). Bahsi geçen çalışmalar farklı ilaç grupları ile tedavi edilen diabetik hastalardan toplanan verilerdir ve belirli bir tedavi yaklaşımının glisemik kontrol üzerindeki etkisini yansıtmamaktadır.

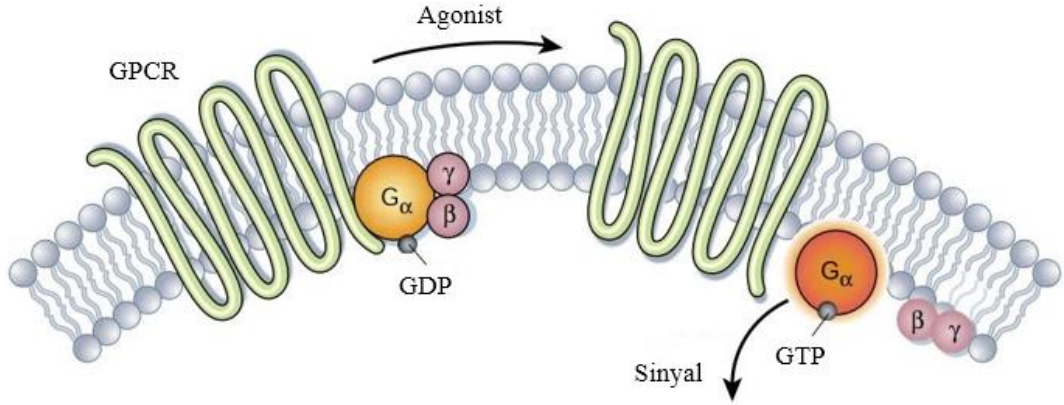
Diabet tedavisinde temel hedef kan şekeri düzeyinin kontrol altında tutulmasıdır. Ne var ki, diabet tedavisinde kullanılan her ilacın kan şekeri düzeyini etkili bir şekilde düşürmelerine rağmen kardiyovasküler komplikasyonlar üzerinde olumlu etkileri olduğundan bahsetmek mümkün değildir. Diabet tedavisinde kullanılan ilaçlardan insülin, sülfonilüreler, tiazolidindionlar, bazı glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) reseptör agonistleri ve bazı dipeptidil peptidaz-4 (DDP-4) inhibitörleri kalp yetmezliği riskini artırırken, metformin, sodyum glukoz ko-transporter-2 (SGLT-2) inhibitörleri

ve bazı GLP-1 reseptör agonistlerinin diabetik kardiyovasküler komplikasyonlar üzerinde olumlu etkileri bilinmektedir (Kenny ve Abel, 2019).

Diabetik hastalarda kalp yetmezliğinde kullanılacak ilaçlar için hazırlanmış bir tedavi kılavuzu bulunmamaktadır. Diabette semptomatik kalp yetmezliği bulunan hastalarda kalp yetmezliğinin tedavisinde rutin olarak kullanılan ilaçlar kullanılmaktadır. İlk basamak tedavi seçeneklerinden olan RAAS'yi hedef alan ilaçların diabetik kalpte de faydalı etkileri olabileceği düşünülmektedir (Kenny ve Abel, 2019). Hem RAAS'yi hedef alan hem de neprilisin (NEP) enzimini bloke ederek dolaşımdaki natriüretik peptid (NP) seviyesini artıran yeni bir ilaç sınıfı olan ARNi'lerin diabetik bireylerde kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde umut vaad edici olduğu düşünülmektedir (Kenny ve Abel, 2019 ve Malek ve Gaikwad, 2017).

1.2. Beta Adrenerjik Reseptörler

β -ARlerin bir alt üyesi olduğu adrenerjik reseptörler, G-protein-kenetli reseptörler (GPCR) sınıfına girmektedirler. GPCR'ler hücre membranının bir tarafından diğer tarafına yedi defa geçerek iç ve dış yüzeyde kıvrımlar meydana getirirler (Wallukat, 2002). Agonist reseptöre bağlandıktan sonra etkinin oluşmasına aracılık eden G proteinleri alfa (α), β ve gama (γ) birimlerinden oluşmuş heterotrimer yapıdadır. Agonistin bağlanması ile reseptör aktive olur ve G proteininin α alt birimi $\beta\gamma$ alt biriminden ayrılır. Eş zamanlı olarak α alt birimine bağlı guanozin difosfat (GDP), guanozin trifosfat (GTP) ile yer değiştirerek ilişkili olduğu ikincil ulak molekülün aktive edilmesine aracılık eder (Şekil 1.2) (Li ve ark., 2002). G proteinlerinin başlıca alt tipleri G_s , G_i , G_q ve G_o 'dur (Kayaalp, 2012).



Şekil 1.2. G protein kenetli reseptör yapısı ve alfa (α) alt biriminin aktivasyonu
GPCR, G protein kenetli reseptör; GDP, guanozin difosfat; GTP, guanozin trifosfat (Li ve ark., 2002)

İlk defa Lands ve arkadaşları tarafından 1967 yılında yapılan çalışmalarla β -AR'lerin β_1 - ve β_2 -AR olmak üzere iki alt türü tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarda β_1 -ARlerin adipoz dokuda yağ asidi metabolizması ve kardiyak stimülasyona, β_2 -AR'lerin ise bronkodilatasyon ve vazodilatasyona aracılık ettiği ortaya konulmuştur (Molinoff, 1984). Sempatik aktiviteden sorumlu olduğu bilinen ilk iki β -AR alt tipinin yanı sıra, katekolaminlerin metabolik etkilerinden sorumlu olduğu düşünülen β_3 -AR'ler ilk defa 1989 yılında klonlanmıştır (Emorine ve ark., 1989). β_1 - ve β_2 -AR dışında kalpte pozitif inotropik etkiye aracılık eden putatif β_4 -AR'lerin de var olduğu öne sürülmüşse de (Kaumann ve Molenaar, 1997), sonrasında bunun aslında β_1 -AR'lerin düşük afiniteli türevi olduğu ortaya konulmuştur (Kaumann ve ark., 2001 ve Kompa ve Summers, 1999).

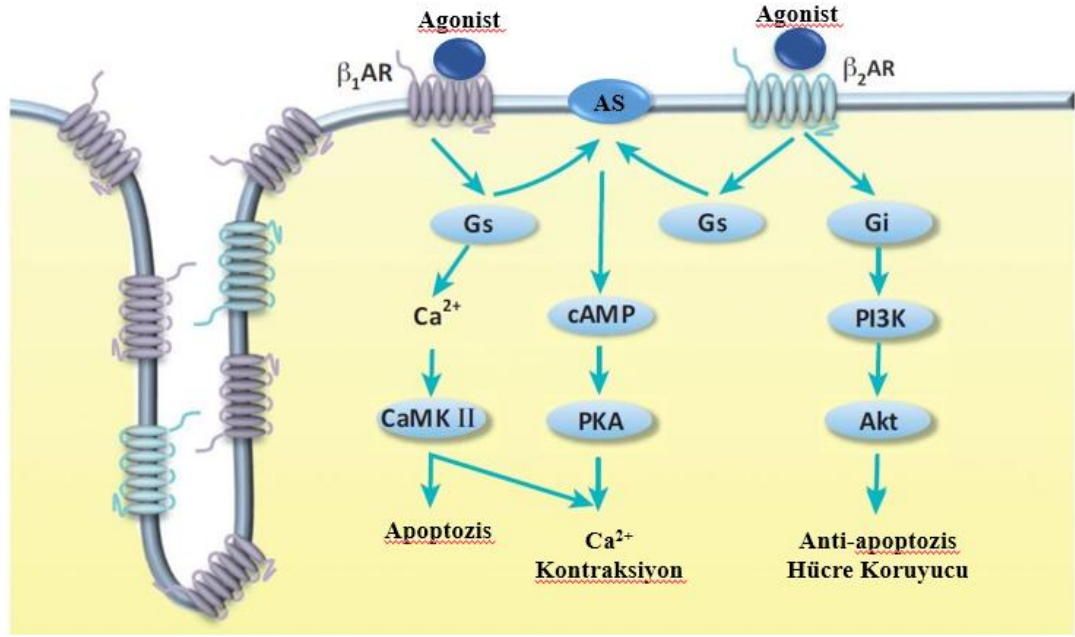
1.2.1. Kalpte Bulunan Beta Adrenerjik Reseptör Alt Tipleri ve Sinyal Mekanizmaları

Kalp dokusunda katekolaminlerin pozitif inotropik, kronotropik ve lusitropik etkilerine aracılık eden β_1 - ve β_2 -AR'lerin (Brodde, 1991 ve Hoffman ve Lefkowitz, 1982) yanı sıra, başlangıçta yalnızca metabolik etkilerinden söz edilen β_3 -AR'ler de insan ventrikül dokusunda tanımlanmıştır (Gauthier ve ark., 1996). Gauthier ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada nadolol (β_1 - ve β_2 -AR antagonisti) varlığında izoprenalin (selektif olmayan β -AR agonist) uygulanması sonucunda negatif inotropik

etki gözlenmiştir. Bu bulgu, β_1 - ve β_2 -AR'lerin aksine β_3 -AR'lerin kalpte negatif inotropik etkiye aracılık ettiğini göstermiştir (Gauthier ve ark., 1996).

Kalp dokusunda β_1 -AR'lerin yoğunluğu daha fazladır ve bu alttipin β -AR aracılı yanıtlardan asıl sorumlu reseptör alt tipi olduğu düşünülmektedir. Ventrikülde tüm β -AR'lerin %70-80'ini β_1 -AR oluştururken, bu oran atriumda %60-70'tir (Brodde, 1991).

β_1 - ve β_2 -AR'lerin her ikisi de Gs proteini ile kenetlidir ve agonistin bağlanması sonucunda $G_{s\alpha}$ alt birimi ikincil ulak adenilil siklaz (AS) aktive eder ve hücre içi siklik adenozin 3',5'-monofosfat (cAMP) miktarı artar. Artan cAMP, protein kinaz A (PKA)'yı aktive eder. Aktive olan PKA, L tipi Ca^{++} kanalı ve birçok sarkolemmal proteinin fosforile ederek kalpte β -AR aracılı yanıtların oluşmasına aracılık eder (Brodde ve Michel, 1999) (Şekil 1.3). L tipi Ca^{++} kanalının fosforilasyonu sonucu membran depolarize olur ve hücre içine Ca^{++} girişi gerçekleşir. PKA tarafından fosforillenen ryanodin reseptörü (RyR2) tarafından hücre içindeki artmış Ca^{2+} miktarı algılanır ve sarkoplazmik retikulumdan (SR) Ca^{++} -aracılı- Ca^{++} -salınımı gerçekleşerek kardiyomiyositlerde kasılma yanıtı başlamış olur (George ve Pitt, 2006). SR Ca^{++} ATPaz (SERCA2a) üzerinde inhibitör özellik gösteren fosfolambanın (PLB), PKA tarafından fosforillenmesi ile sitozoldaki Ca^{++} SR'a geri alınır ve böylece gevşeme yanıtı başlatılır. Kardiyak gevşemede rol alan diğer bir yolak, troponin I'nın PKA tarafından fosforillenmesi sonucu troponin C ve buna bağlı olarak miyoflamentlerin Ca^{++} 'a duyarlılığının azalmasıdır (Kaumann ve Molenaar, 1997).



Şekil 1.3. Kalpte β_1 ve β_2 -AR'lerin hücre içi sinyalizasyon yolları

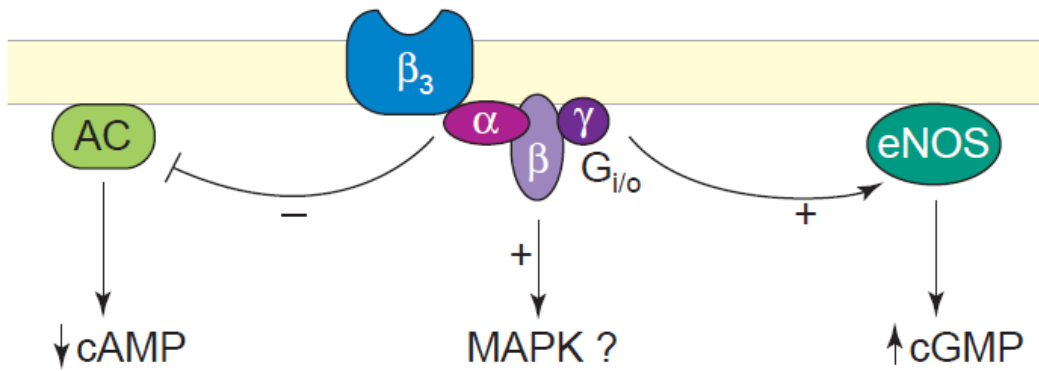
AR, adrenerjik reseptör; AS, adenilil siklaz; CaMKII, Ca^{++} /Kalmodulin kinaz II; cAMP, siklik adenosin 3',5'-monofosfat; PKA, protein kinaz A; PI3K, fosfotidilinositol-3-kinaz; Akt, protein kinaz B. (Fu ve ark., 2017b)

β_2 -AR'ler, β_1 -AR'lerin aksine Gs proteininin yanı sıra pertussis toksin (PTX) duyarlı-Gi proteinini ile de kenetlenebilmektedir (Xiao ve ark., 1999). β -AR'lerin PKA aracılı fosforilasyonunun artması reseptör desensitizasyonu sonucunda Gs kenetlenmesinde azalmaya Gi kenetlenmesinde ise artışa neden olur (Daaka ve ark., 1997). β_2 -AR'lerin Gi ile bağlanması cAMP miktarı ve buna bağlı PKA aktivasyonunda azalmaya neden olduğu için kardiyak kontraktileti olumsuz yönde etkilemektedir (Woo ve Xiao, 2012). Bunun yanı sıra, Gs proteini kenetli β_1 -AR'lerin sürekli agonistle uyarılması, PKA aracılı yoldan bağımsız olarak, Ca^{++} /Kalmodulin kinaz II (CaMKII) aracılı yolağı aktive ederek apoptozise neden olurken (Zhu ve ark., 2003), β_2 -AR'ler Gi proteini aracılı fosfotidilinositol-3-kinaz (PI3K) ve protein kinaz B (Akt) aktivasyonu ile apoptozisi inhibe etmekte ve kardioprotektif etki göstermektedir (Zhu ve ark., 2001) (Şekil 1.3).

Kalpte bulunan β_3 -AR'lerin aktive olması için β_1 ve β_2 -AR'ler için gerekenden daha fazla katekolaminle uyarılmaları gerekmektedir (Berlan ve ark., 1995). Bunun yanı sıra, β_3 -AR'ler hem desensitizasyona hem de reseptör downregülasyonuna β_1 - ve

β_2 -AR'lerden daha dayanıklıdır (Gauthier ve ark., 2000). Kalp yetmezliğinde sempatik sinir sistemi (SSS) aktivasyonu ve buna bağlı artan katekolamin miktarına bağlı olarak β_1 - ve β_2 -AR aracılı yanıtlar kaybolurken, β_3 -AR aracılı yanıtlar korunmaktadır (Moniotte ve ark., 2001). β_3 -AR'lerin, kalp yetmezliği gibi patofizyolojik durumlarda artan SSS aktivasyonuna karşı kalbi koruduğu düşünülmektedir (Kayki-Mutlu ve ark., 2019).

β_3 -AR'ler, β_1 - ve β_2 -AR'lerin aksine G_i/o_a proteini ile kenetlidir. Agonist bağlanması ile G_i/o_a alt birimi aktive olarak endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ifadenmesini uyarmaktadır. eNOS aracılı oluşan nitrik oksit (NO) ikincil ulak guanilil siklazı (GS) aktive eder ve hücre içi siklik guanozin 3',5'-monofosfat (cGMP) miktarı artar. Artan cGMP, protein kinaz G (PKG) aktivasyonuna neden olur. PKG, L tipi Ca^{++} iyon akımında azalmaya neden olarak ve/veya Ca^{++} akımından bağımsız miyoflamentlerin proteinler aracılığıyla oluşan kasılma yanıtını negatif yönde etkileyerek gevşeme yanıtına neden olur. cGMP ile uyarılan fosfodiesteraz-II'nin (PDE-II) hücre içi cAMP miktarında azalmaya yol açması da β_3 -AR aracılı gevşemeyi tetikleyen diğer bir yoldur (Rozec ve Gauthier, 2006). Bunun yanı sıra, G_i alt biriminin mitojenle-aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağını aktive ettiği ve böylece β_3 -AR'lerin negatif inotropik etkilerine aracılık ettiği düşünülmektedir (Gauthier ve ark., 2000) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Kalpte β_3 -ARlerin hücre içi sinyalizasyon yolları
AC, adenilil siklaz; cAMP, siklik adenozin monofosfat; MAPK, mitojenle aktive olan protein kinaz; eNOS, endotelial nitrik oksit sentaz; cGMP, siklik guanozin monofosfat (Gauthier ve ark., 2000).

1.2.2. Diabetin Kardiyak Beta Adrenerjik Reseptörler Üzerine Etkisi

Diabette artan SSS aktivasyonuna bağlı olarak dolaşımda ve kalp dokusunda katekolamin miktarı artmaktadır (Ferraro ve ark., 1990; Fushimi ve ark., 1982 ve Perin ve ark., 2001). Ne var ki, artan katekolamin miktarına rağmen, kalbin bu hormonlara yanıtverirliliği azalmıştır (Dhalla ve ark., 1998). β -AR aracılı yanıtların değişmesi, diabette kardiyak disfonksiyona neden olan faktörlerden biridir (Varma ve ark., 2018).

Diabetik bireylerde β_1 - ve β_2 -AR aracılı yanıtlarda herhangi bir değişim olmamasına karşın (Dinçer ve ark., 1998 ve Wilson ve ark., 2017) her iki reseptörün mRNA düzeylerinde azalma olduğu gösterilmiştir (Dinçer ve ark., 2003). Yapılan diğer çalışmalarda ise, hem tip 2 (Lamberts ve ark., 2014) hem de tip 1 diabetik bireylerde kardiyak β -AR duyarlılığında azalma olduğu ortaya konulmuştur (Berlin ve ark., 1986 ve Korytkowski ve ark., 1998). β -AR aracılı kasılma yanıtındaki azalmanın β -AR ifadenme düzeyi azalmaksızın alt yolak bileşenlerinde meydana gelen değişimlerden kaynaklandığı öne sürülmüştür (Lamberts ve ark., 2014).

Sıçanlarda streptozotosin (STZ) ve alloksan ile oluşturulmuş diabet modelinde izoprenalin (selektif olmayan β -AR agonist) aracılı kalp atım hızının ve noradrenalin (selektif β_1 -AR agonist) duyarlılığının azalması diabette β -AR aracılı yanıtlarda azalma olduğunu göstermektedir (Foy ve Lucas, 1976). Diabette β -AR ifadenme düzeyindeki azalma ilk defa Savarese ve Berkowitz tarafından kanıtlanmıştır. STZ diabetik sıçanlarda kalp atım hızındaki %24 azalmaya paralel olarak kardiyak β -AR yoğunluğunda %28 azalma olduğu bulunmuştur (Savarese ve Berkowitz, 1979). STZ diabetik sıçanlarda yapılan çalışmalarda β -AR aracılı fonksiyonel yanıtlardaki azalma hem β -AR ifadenme düzeyinde hem de AS aktivitesindeki azalmayla ilişkilendirilmiştir (Götsche, 1983; Mooradian ve ark., 1988 ve Sundaresan ve ark., 1984). Ne var ki, AS aktivitesinde azalma olmaksızın, tek başına β -AR ifadenme düzeyindeki azalma da β -AR aracılı yanıtlarda azalmaya yol açmaktadır. Bu çalışmada AS aktivitesi sıçanlara alloksan uygulanmasından beş gün sonra ölçülmüştür (Ingebretsen ve ark., 1983). Bir diğer çalışmada ise STZ diabetik sıçanlarda diabet tablosunun doğrulanmasının ardından 2. haftada azalan β -AR ifadenme düzeyine

rağmen AS aktivitesi değişmezken, 4. haftada AS aktivitesinde de azalma gözlenmiştir (Atkins ve ark., 1985). Tip 2 diabetik *Zucker diabetic fatty* (ZDF) sıçanlarda ise 10 haftalık diabet süresinin ardından hem β -AR ifadenme düzeyinde hem de AS aktivitesinde azalma olduğu bulunmuştur (Huisamen ve ark., 2001). Bu veriler, β -AR ifadenme düzeyi ve AS aktivitesinde gözlenen azalmanın diabetin süresiyle ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

STZ diabetik sıçanlarda 8 haftalık diabet süresi sonunda β_1 - ve β_2 -AR aracılı yanıtlar değişmezken, 14 haftalık diabet süresi sonunda diabetik atriumda izoprenalin ve noradrenalin uygulaması sonucu maksimum kasılma yanıtı azalmıştır. Bununla birlikte kalbin fenoterole (selektif β_2 -AR agonist) verdiği yanıt değişmemiştir (Dinçer ve ark., 1998). Dinçer ve arkadaşlarının 14 haftalık STZ diabetik sıçanlardan alınan tüm kalp dokusunda β_1 - ve β_2 -AR'lerin protein düzeyinin azaldığını β_3 -AR'lerin ise arttığını göstermiştir. Aynı çalışmada β_2 -AR mRNA düzeyinde ise artış gözlenmiştir. Bu durum, diabetin β_2 -AR degradasyonunda artışa veya posttranslasyonel modifikasyonlara neden olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Dinçer ve ark., 2001). STZ diabetik sıçanlarda kardiyak β_1 -AR protein miktarı azalırken (Aragno ve ark., 2012 ve Carillion ve ark., 2017) kardiyak fonksiyon üzerinde koruyucu etkisi olduğu düşünülen β_3 -AR protein miktarının arttığı gösterilmiştir (Arioglu-Inan ve ark., 2013 ve Carillion ve ark., 2017). STZ diabetik sıçanlarda Dinçer ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptığı çalışmayla paralel olarak kalpte β_1 - ve β_2 -AR'lerin protein miktarının azaldığı, β_3 -AR protein miktarının ise arttığı gösterilmiştir (Bidasee ve ark., 2008). Tip 1 diabetik farelerde ise β_2 -AR protein miktarındaki azalmanın kardiyak disfonksiyona neden olduğu ortaya konulmuştur (Mishra ve ark., 2010).

Yüksek yağlı diyetle oluşturulan tip 2 diabetik fare modelinde izoprenalin aracılı kasılma ve gevşeme yanıtlarında azalmaya rağmen, β_1 - ve β_2 -AR protein düzeyinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Fu ve ark., 2017a ve Wang ve ark., 2017). Aynı hayvan modeli üzerinde yapılan bir diğer çalışmada ise, STZ diabetik sıçanlarda yapılan çalışmaların (Arioglu-Inan ve ark., 2013; Bidasee ve ark., 2008; Carillion ve ark., 2017 ve Dinçer ve ark., 2001) aksine, kardiyak β_3 -AR protein miktarının azaldığı gösterilmiştir (Kleindienst ve ark., 2016). Tip 2 diabetik db/db farelerde de azalmış β -

AR aracılı yanıtı rağmen β_1 -AR protein miktarı değişmemiştir (Daniels ve ark., 2010). Zucker obez sıçanlar ile yüksek yağlı diyet ve düşük doz STZ ile oluşturulan tip 2 diabetik sıçanlarda kasılma yanıtı ve kalp atım hızındaki azalma kardiyak β_3 -AR protein miktarında değişme olmaksızın, β_1 - ve β_2 -AR protein miktarındaki azalmayla ilişkili bulunmuştur (Haley ve ark., 2015a ve Jiang ve ark., 2015). ZDF sıçanlarda kalp atım hızı azalırken kalbin kasılabilirliği değişmemiştir. Çalışmada β_1 - ve β_2 -AR protein miktarının azaldığı ve β_3 -AR protein miktarının arttığı ortaya konulmuştur (Haley ve ark., 2015b).

1.3. Renin-Anjiyotensin-Aldosteron Sistemi (RAAS)

RAAS, vücutta kan basıncını düzenlenmesinden sorumlu temel nörohormonal sistemdir. Böbrekte arter basıncının düşmesi sonucu jukstaglomerular hücrelerde inaktif haldeki prorenin renine dönüşmektedir Renin, anjiyotensinojenin anjiyotensin (Ang) I'e dönüşümünü sağlamaktadır. Ang-I ise anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) aracılığıyla Ang-II'ye dönüşmektedir Ang-II, RAAS'nin vücuttaki asıl etkilerinden sorumlu olan moleküldür ve etkisini anjiyotensin tip 1 reseptör (AT1R) ile anjiyotensin tip 2 reseptörlerine (AT2R) bağlanarak göstermektedir (Tamargo ve Tamargo, 2017). Ang-II'nin AT1R'ye bağlanması ile vazokonstriksiyon, endotel hasarı, proinflammatuvar ve profibrotik genlerin ifadenmesinde artış, hipertrofi ve apoptoziste artış, sodyum (Na^+) ve su tutulumu ile artmış SSS aktivitesi ve oksidatif stres yanıtları ortaya çıkmaktadır. AT1R aracılı yanıtlar kardiyovasküler ve renal hastalıkların patogenezinde rol oynamaktadır (Malek ve Gaikwad, 2017 ve Tamargo ve Tamargo, 2017). Ang-II'nin AT2R'ye bağlanması ile AT1R aracılı yanıtların aksine vazodilatör, natriüretik, antifibrotik, antiproliferatif ve antiinflammatuvar etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu yanıtlar dokular üzerinde koruyucu etkiye sahiptir (Colafella ve ark., 2019). RAAS'yi hedef alan, klinikte renal ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlar ACE inhibitörleri (ACEi), AT1R blokerleri (ARB) ve mineralokortikoid reseptör antagonistleridir (Tamargo ve Tamargo, 2017).

RAAS, hipertansiyon, ateroskleroz, böbrek yetmezliği, kalp yetmezliğinin yanı sıra diyabet nedeniyle renal ve kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisinde de önemli rol oynamaktadır (Malek ve Gaikwad, 2017). Diyette hiperglisemeye bağlı olarak kan volümünün azaması, böbrek arteriyel kan basıncında düşmeye neden olur ve RAAS düşen kan basıncını düzenlemek üzere aktive olur (Sivasankar ve ark., 2018). Bunun yanı sıra diyette artan oksidatif stres, dolaşımda ve dokularda Ang-II miktarının artmasına neden olur (Lim ve ark., 2004). Diyabetik kalpte Ang-II reseptör yoğunluğu ve mRNA seviyesi artmıştır (Boudina ve Abel, 2007). Kalp dokusunda artan Ang-II, insülin rezistansını ve oksidatif stresi artırır, endotel disfonksiyonuna yol açar (Sivasankar ve ark., 2018). Ang-II aynı zamanda reaktif oksijen ürünlerinin artmasına ve/veya doğrudan AT1R aracılığı ile hipertrofi ve fibrozise neden olarak (Bader, 2010), diyabetik kardiyomiopatinin gelişmesine ve ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (Sivasankar ve ark., 2018).

Diyette meydana gelen kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde ve/veya tedavisinde RAAS'yi hedef alan ilaçların yararlı etkileri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. *The Heart Outcomes Prevention Evaluation* (HOPE) ve *The Microalbuminuria, Cardiovascular, and Renal Outcomes* (MICRO) HOPE klinik çalışmaları ramiprilin (ACEi) diyabetik bireylerde gelişen kardiyovasküler hastalık riskini %25-30 oranında, kardiyovasküler nedeniyle mortaliteyi ise %37 oranında azalttığını göstermektedir (Investigators, 2000). Ne var ki, sonraki yıllarda yapılan *The Diabetes Reduction Assessment with Ramipril and Rosiglitazone Medication* (DREAM) klinik çalışmasında diyabetik bireylerde ramiprilin kardiyorenal komplikasyonlar açısından plasebo tedavisine bir üstünlüğü olmadığı ortaya konulmuştur (Gerstein ve ark., 2008b).

The Candesartan in Heart Failure—Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity Program (CHARM) klinik çalışmasında kandesartanın (ARB) diyabetik hastalarda kardiyovasküler hastalık gelişmesinde koruyucu etkisi gösterilmiştir (Yusuf ve ark., 2005). *The Valsartan Antihypertensive Long-term Use Evaluation* (VALUE) klinik çalışmasında valsartan (ARB) tedavili grupta, yeni başlangıçlı diyabet tablosunun %23 oranında daha az görülmesi valsartanın glukoz metabolizması üzerinde olumlu

etkisi olduğunu göstermektedir (Julius ve ark., 2004). Kardiyovasküler hastalık öyküsü bulunmayan tip 2 diabetik hastalarda ramipril (ACEi) ve telmisartan (ARB) tedavilerinin benzer oranda sol ventrikül diyastolik fonksiyonunda iyileşmeye yol açtığı bildirilmiştir (Symeonides ve ark., 2007).

Klinik çalışmaların yanı sıra RAAS'yi hedef alan ilaçların diabetik kalpteki etkilerini ve etki mekanizmalarını inceleyen prelinik çalışmalar da bulunmaktadır. Spontan diabetik BB sıçanlarda, kaptopril (ACEi) tedavisi miyokardiyal perfüzyonu iyileştirerek kalp üzerinde koruyucu etki göstermiştir (Rösen ve ark., 1995). Tip 1 diabetik sıçan modelinde ise enalapril (ACEi), losartan (ARB) ve kandesartanın (ARB) kardiyak fonksiyon üzerindeki koruyucu etkileri Ca^{++} homeostazını iyileştirmeleri ile ilişkili bulunmuştur (Liu ve ark., 2006 ve Yaras ve ark., 2007). Hem tip 2 hem de tip 1 diabetik sıçan modellerinde ise irbesartan (ARB) ile valsartanın (ARB) ER strese azalmaya neden olarak kardiyak *remodeling*i azalttığı ve kardiyak fonksiyonu iyileştirdikleri ortaya konulmuştur (Liu ve ark., 2015 ve Wu ve ark., 2011).

1.4. Natriüretik Peptidler

Kalp yetmezliği patofizyolojisinde, SSS ve RAAS'nin yanı sıra NP sistemi de önemli rol oynamaktadır. Kalp yetmezliğinin erken döneminde kompensatuvar rol oynayan SSS ve RAAS aktivasyonu ilerleyen süreçte hastalığın kötüleşmesine neden olurken, NP sistemi aktivasyonu kalp yetmezliği patofizyolojisini olumlu yönde etkilemektedir (Volpe ve ark., 2016). NP'ler atrial natriüretik peptid (ANP), B-tipi natriüretik peptid (BNP), C-tipi natriüretik peptid (CNP), dendroaspis natriüretik peptid (DNP) ve ürodilatin olmak üzere beş alt tipi bulunan nörohormonlardır (Fu ve ark., 2018). Kardiyovasküler hastalıkların homeostazında rol oynayan natriüretik peptidler ise ANP, BNP ve CNP'dir (Daniels ve Maisel, 2007). ANP ve BNP normal fizyolojik koşullarda atriumda depolanmış halde bulunurken (Potter ve ark., 2006), kalpte volüm artışına bağlı olarak ANP ve BNP sırasıyla atrium ve ventriküldeki kardiyomiyositlerde sentezlenir (Singh ve ark., 2017). CNP ise yoğunlukla beyinde sentezlenmekte, kondrosit ve endotel hücrelerde de yüksek konsantrasyonda

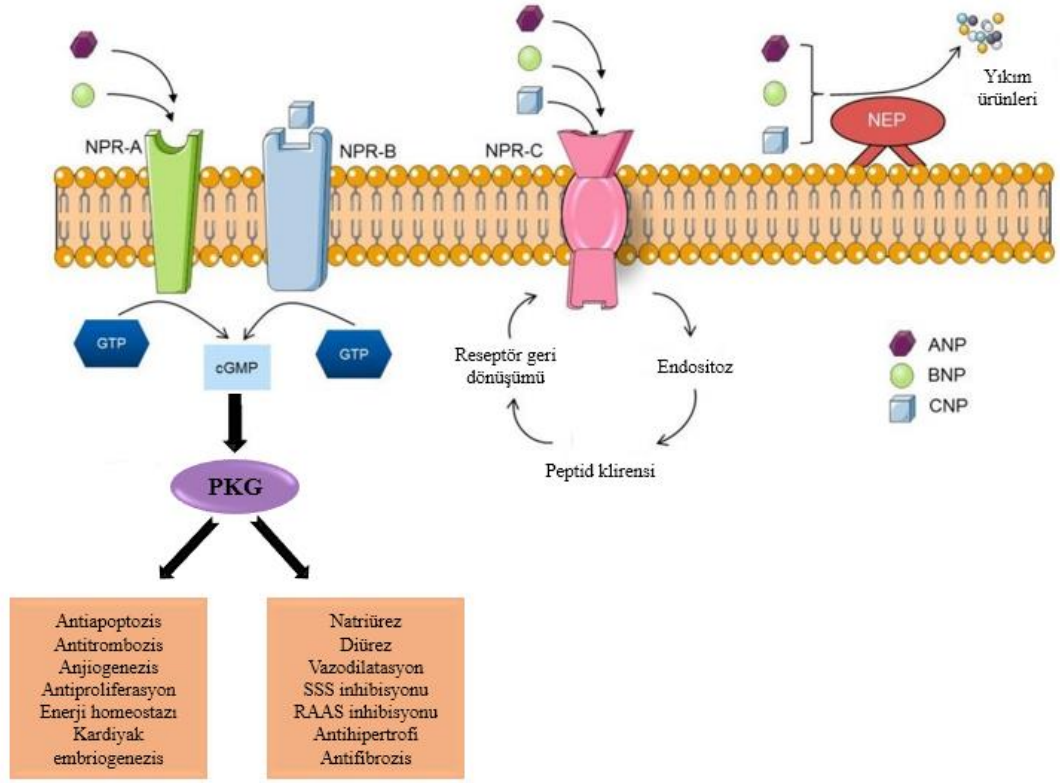
bulunmakla birlikte (Volpe ve ark., 2016) kalp dokusunda da sentezlenmektedir (Daniels ve Maisel, 2007). ANP ve BNP etkilerini natriüretik peptid reseptör (NPR)-A'ya bağlanarak gösterirken; CNP etkilerini NPR-B üzerinden gösterir (Singh ve ark., 2017).

Kalp yetmezliğinde aşırı volüm artışına bağlı olarak hem atrium hem de ventrikülde BNP mRNA ifadelenmesi uyarılır ve dolaşımdaki BNP miktarı artar (Luchner ve ark., 1998). Hem ANP hem de BNP, NPR-A'ya bağlandığında GS aktive olur ve ikincil ulak cGMP miktarı artar. cGMP ise PKG aracılığıyla damar, kalp ve böbrek gibi hedef organlarda çeşitli alt yolları aktive ederek (Singh ve ark., 2017), vazodilatasyon, diürez, natriürez ve RAAS'de inhibisyon oluşturur, böylece kalbin hem ön yük (*afterload*) hem de ard yükünde (*preload*) azalmaya neden olur (Nakagawa ve ark., 1995 ve Volpe ve ark., 2016). Bunun yanı sıra NP'ler, NPR-A aracılığıyla kardiyak *remodeling*de azalmaya neden olurlar ve antiiskemik, antiproliferatif, antimitojenik, pozitif lusitropik etkilere de aracılık ederler (Chen, 2007 ve Singh ve ark., 2017) (Şekil 1.5). Kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisinde rol oynayan natriüretik peptidler (ANP, BNP ve CNP) dolaşımdan NPR-C ve NEP enzimi aracılığıyla degrade olarak uzaklaştırılırlar (Chen, 2007).

Kalp yetmezliğinde kompensatuvar mekanizma olarak dolaşımda artan BNP seviyesi, hastalığın tanısında kullanılan bir laboratuvar bulgusudur (Doust ve ark., 2006). Her ne kadar hastalığın akut döneminde dolaşımda BNP miktarı artış gösterse de kalp yetmezlikli hastalarda uzun dönemde dolaşımda BNP'nin aktif formunda eksiklik ve/veya BNP'nin etkilerine direnç gelişmesi ortaya çıkmaktadır (Chen, 2007). Kalp yetmezliğinde volüm ve/veya basınç artışına bağlı olarak artan duvar stresi sonucunda, ventriküllerde pre-proBNP sentezlenmesi uyarılır. pre-proBNP'den öncelikle proBNP₁₋₁₀₈ peptidi oluşur, sonrasında bu peptid aktif form olan BNP₁₋₃₂ ile inaktif form olan amino terminal fragmana (NT-proBNP) parçalanır (Daniels ve Maisel, 2007). NT-proBNP'nin yarılanma ömrü 1-2 saat iken BNP'nin yarılanma ömrü 20 dk'dır. Bu durum 1:1 oranında salgılanmalarına rağmen dolaşımda NT-proBNP'nin daha yüksek konsantrasyonda bulunmasına ve BNP'ye oranla dolaşım konsantrasyonunda daha az dalgalanma gözlenmesine yol açmaktadır (Daniels ve

Maisel, 2007). Bunun yanı sıra BNP'nin aksine NT-proBNP, NPR-C ve NEP enziminin substratı değildir, böbrekler aracılığıyla vücuttan uzaklaştırılır (Vickery ve ark., 2005). Bu noktalardan hareketle, kalp yetmezliğinin tanısında ve kullanılan ilaçların etkinliğinin takip edilmesinde BNP seviyesi yerine NT-proBNP seviyesinin ölçülmesi daha mantıklı görünmektedir (Daniels ve Maisel, 2007).

NP'lerin kalp üzerindeki koruyucu etkileri ve kalp yetmezliğinin ileri aşamalarında dolaşımda NP seviyesinin azaldığı düşünüldüğünde, kalp yetmezliğinde NP seviyesini artıran tedavi yaklaşımlarının uygulanması akla yatkındır. Bu durum ekzojen NP'lerin uygulanması ve/veya NP'lerin yıkımının engellenmesi fikrini doğurmuştur (Mangiafico ve ark., 2013). Bu amaçla öncelikli olarak BNP analogu nesiritid (rekombinant insan BNP) kardiyovasküler hastalığı bulunan bireylerde tedavi amacıyla kullanılmış fakat uzun dönemde kalp yetmezliğine bağlı hastaneye yatış ve ölüm oranında iyileşmeye neden olmadığı gözlenmiştir (O'Connor ve ark., 2011). Bununla birlikte nesiritidin kısa yarılanma ömrüne sahip olması ve intravenöz yoldan uygulanması (Kang ve Banerjee, 2017), araştırmacıları NP'lerin yıkımının azaltılarak dolaşımdaki miktarlarının artırılmasına yönelik tedavi yaklaşımları geliştirmeye yönlendirmiştir (Malek ve Gaikwad, 2017).



Şekil 1.5. Natriüretik peptidlerin etki mekanizmaları, etkileri ve metabolizmaları (Singh ve ark., 2017 ve Volpe ve ark., 2016)

1.5. Neprilisin (NEP) Enzimi

NEP enzimi, çinko metalloproteinaz enzim ailesinin prototipidir (Turner ve ark., 2002). Memelilerde NEP enziminin fizyolojik rolü ilk defa beyinde tanımlanmış olmakla birlikte, NEP enzimi en yüksek oranda böbreklerde ve diğer birçok dokuda bulunmaktadır (Turner ve ark., 2001). NEP enzimi, kardiyovasküler sistem, sinir sistemi ve immün sistemde düzenleyici rol oynayan NP'ler, bradikinin, adrenomedullin, opioidler, taşikininler, bradikinin, endotelin I, Ang-I, Ang-II, amiloid β peptid, gastrin ve P maddesinin de içinde bulunduğu birçok peptidin metabolizmasında görev alır (McMurray ve ark., 2014; Turner ve ark., 2001 ve Turner ve ark., 2002).

NEP enziminin vazodilatör etkili NP'lerin yıkımından sorumlu olması, enzimin inhibisyonunu sağlayan tedavi yaklaşımlarının kardiyovasküler hastalıkların

tedavisinde yararlı etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Ne var ki, bu amaçla kullanılan ilk NEP enzim inhibitörü kandoksatril ile yapılan çalışmaların bir kısmında NP'lerin dolaşım konsantrasyonunun artması sonucunda natriürez ve diürez oluşumuna bağlı olarak ilaç kan basıncını düşürse de, çalışmaların büyük bir çoğunluğunda hipertansif veya kalp yetmezlikli hastalarda bu etkiler gösterilememiş ve ilaç piyasadan çekilmiştir (McDowell ve Nicholls, 2000). NEP enzimi NP'lerin yanı sıra vazokonstriktör özellik gösteren peptidlerin (Ang-I, Ang-II ve endotelin-I) yıkımından da sorumludur ve enzim inhibisyonu ile bu peptidlerin de dolaşımdaki konsantrasyonları artmaktadır. Tek başına NEP enzim inhibisyonunun hem vazodilatasyona hem de vazokonstrüksiyona yol açması tedavide NEP enzim inhibisyonu yapan ilaçlarla RAAS üzerinde inhibitör özellik gösteren ilaçların kombine olarak kullanılması fikrini gündeme getirmiştir (Kang ve Banerjee, 2017).

Hem NEP enzimini hem de ACE'yi aynı anda inhibe eden ajanlara vazopeptidaz inhibitörleri denilmektedir. Klinik etkinliği üzerinde en fazla çalışma yapılmış olan vazopeptidaz inhibitörü omapatrilat isimli moleküldür (Weber, 2001). Omapatrilat, hipertansiyon ve kalp yetmezliği tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Bileşik, hem NP, bradikinin, adrenomedullin gibi vazodilatör peptidlerin yıkımını önlemekte hem de Ang-II oluşumunu engelleyerek etki göstermektedir (Kostis ve ark., 2004). Omapatrilat ile tedavi edilen hipertansif hastalarda hem sistolik hem de diyastolik kan basıncının, tek başına ACEi kullanılan hastalara oranla daha çok düştüğü gösterilmiştir (Campese ve ark., 2001). Omapatrilatın kalp yetmezliği tedavisinde hastalığın seyrini iyileştirilmesi ve ölüm oranını düşürmesi açısından tek başına ACEi tedavisinden daha avantajlı olabileceği ortaya konulmuştur (Rouleau ve ark., 2000). Daha geniş ölçekli *The Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events* (OVERTURE) klinik çalışmasında ise kalp yetmezlikli hastalarda omapatrilat hastaneye yatış ve ölüm oranını azaltmasına rağmen tek başına ACEi tedavisinden daha üstün bulunmamıştır (Packer ve ark., 2002). Yapılan klinik çalışmalarda omapatrilat ile tedavi edilen hastalarda, tek başına ACEi tedavisi uygulanan hastalara oranla daha fazla anjiyoödem geliştiği gözlenmiştir (Kostis ve ark., 2004 ve Packer ve ark., 2002). Bu durum, NEP enzimi ve ACE'nin eş zamanlı inhibisyonu sonucunda bradikinin ve P maddesinin aşırı miktarda artmasının yanı sıra

NEP enziminin substratı olan aminopeptidaz P'nin de miktarının artmasından kaynaklanmaktadır (Singh ve ark., 2017). Vazopeptidaz inhibitörlerinin yan etkileri neprilisinin inhibitörlerinin (NEPi) RAAS'yi inhibe eden fakat anjiyoödem riskini artırmayan ARB'ler ile kombine edilmesi fikrinin ortaya çıkmasına neden olmuştur (Gu ve ark., 2010).

Şimdiye kadar NEP enziminin ve bu enzimi inhibe eden ilaçların daha çok kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri üzerinde durulmuştur. NEP enziminin adipositlerde de ifadelenmesi, araştırmacıları metabolik hastalıklar ile bu enzimin aktivitesi arasındaki ilişkiyi araştırmaya yönlendirmiştir. Obezite ve azalmış insülin duyarlılığının hem plazmada hem de adipositlerde artan NEP enzim miktarı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Standeven ve ark., 2011). Bununla birlikte NEP enzim inhibisyonun, obezite ve diabette β hücre fonksiyonunu, glukoz metabolizmasını ve insülin duyarlılığını iyileştirdiği ortaya konulmuştur (Arbin ve ark., 2003; Jordan ve ark., 2017; Seferovic ve ark., 2017 ve Wu ve ark., 2010). NEP geni çıkarılmış ve yüksek yağlı diyetle beslenmiş farelerde ise pankreas β hücre miktarında artış olduğu gösterilmiştir (Parilla ve ark., 2018). Tüm bu veriler, NEPi'lerin obezite ve diabet tedavisinde etkili bir tedavi seçeneği olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, NEPi'lerin tek başına ve/veya ACEi ile kombinasyonunun yan etkileri düşünüldüğünde, tedavide ARB grubu ilaçlarla kombinasyonları kullanılmalıdır (Esser ve Zraika, 2019).

1.6. LCZ696 (Valsartan/sakubitril): Kalp Yetmezliğinde Yeni Tedavi Yaklaşımı

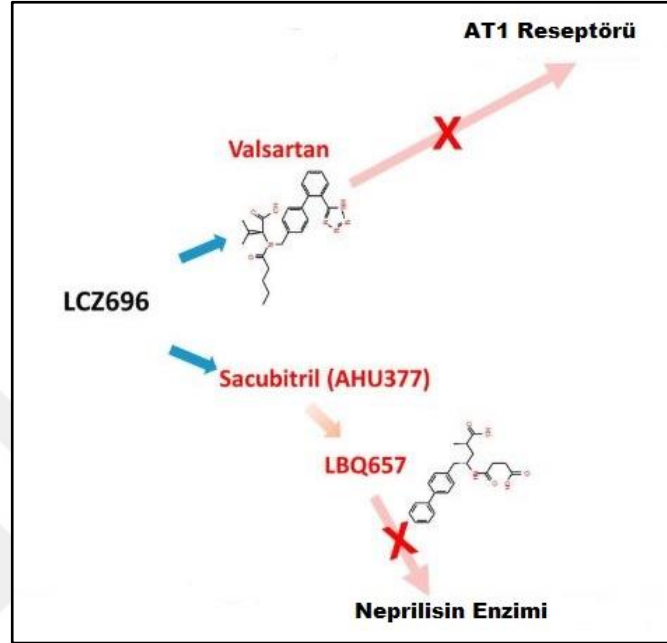
Kalp yetmezliği patofizyolojisinde, SSS ve RAAS aktive olarak, hastalığın erken döneminde kompensatuvar mekanizma ile dolaşım homeostazını sağlayıp olumlu etkiler gösterse de her iki sistemin uzun süreli aktivasyonu prognozu kötüleştirmektedir. Bu nedenle SSS'yi inhibe eden ilaçlar (β blokerler) ve RAAS'yi inhibe eden ilaçlar (ACEi ve ARB) kalp yetmezliğinde kullanılan klasik tedavi yaklaşımlarıdır. Bunun yanı sıra son yıllarda, vazodilatör, natriüretik ve diüretik etki gösteren NP'lerin kalp yetmezliği tedavisinde kullanılması gündeme gelmiştir (Volpe

ve ark., 2016). NP'lerin vücuttaki miktarını artıran ekzojen NP uygulaması (O'Connor ve ark., 2011), N'lerin yıkımını önleyen NEP enziminin tek başına (McDowell ve Nicholls, 2000) veya ACE enzimi ile eşzamanlı olarak inhibe edilmesine (Kostis ve ark., 2004 ve Packer ve ark., 2002) yönelik tedavi yaklaşımlarının klinik çalışmalar sonucunda neden oldukları yan etkiler sebebiyle kalp yetmezliği tedavisinde kullanımları uygun bulunmamıştır. Bu veriler, ARB ve NEPi kombinasyonu anjiyotensin reseptör blokeri-neprilisin inhibitörü (ARNi) grubu ilaçların kalp yetmezliği tedavisinde yan etkisi daha az ve etkinliği daha yüksek bir tedavi seçeneği olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır.

Valsartan/sakubitril kombinasyonu LCZ696, ARNi ilaç grubunun ilk üyesidir (Vardeny ve ark., 2013). LCZ696, 2015 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından düşük ejeksiyon fraksiyonlu kalp yetmezliği (HFrEF) tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır (FDA, 4/5/2020). LCZ696, valsartan ile sakubitrilin 1:1 kombinasyonudur. Sakubitril diğer adıyla AHU377 bir ön ilaçtır ve oral yolla alınmasını takiben enzimatik reaksiyon sonucu bileşiğin aktif formu olan LBQ657'ye dönüşür (Vardeny ve ark., 2014). Valsartan kalp üzerindeki olumlu etkilerini AT1R'yi bloke ederek, LBQ657 ise NEP enzimini inhibe ederek göstermektedir (Mangiafico ve ark., 2013) (Şekil 1.6). Biyoyararlamın çalışmaları valsartan maruziyeti açısından günde 2 defa uygulanan 200 mg LCZ696 (97 mg/ 103 mg sakubitril/valsartan) ile günde 2 defa uygulanan 160 mg valsartanın birbirine eşdeğer olduğunu göstermiştir (Gu ve ark., 2010).

Kardiyovasküler sistem homeostazında görev alan NP'lerin NEP enziminin substratı oldukları bilinmekle birlikte, NEP enziminin sadece BNP metabolizması üzerinde direkt etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Semenov, 6/6/2020). BNP, NEP enziminin substratı iken NT-proBNP bu enzim aracılığıyla metabolize edilmemektedir. Bu nedenle kalp yetmezliğinde LCZ696'nın etkinliği değerlendirilirken NT-proBNP seviyesinin ölçülmesi önerilmektedir (Singh ve ark., 2017). Ne var ki, yapılan klinik çalışmalarda LCZ696 tedavisi uygulanan hastalarda NT-proBNP seviyesinin düştüğü bildirilmiştir (Jhund ve ark., 2014 ve Packer ve ark., 2015). Bunun nedeni LCZ696'nın NEP enzimi üzerindeki inhibitör etkisinin,

hastalığın farklı tiplerinde ve farklı aşamalarında değişiklik göstermesi ve dolaşımında artan BNP seviyesinin proBNP yapımını azaltması ve buna bağlı olarak NT-proBNP seviyesinin azalması olabilir (Semenov, 2015).



Şekil 1.6. LCZ696'nın molekül yapısı ve etki yerleri (Vardeny ve ark., 2014).

Prospective Comparison of ARNI with ACEI to Determine Impact on Global Mortality ve Morbidity in Heart Failure (PARADIGM-HF) klinik çalışmasında HFrEF'li hastalarda LCZ696 ve enalapril tedavileri karşılaştırılmıştır. LCZ696 hastalığa bağlı hastaneye yatış oranını enalapriden %21 daha fazla azaltmıştır. Bununla birlikte, LCZ696 tedavisi alan hastalarda kardiyovasküler nedenlere bağlı ölüm oranı %20, tüm nedenlere bağlı ölüm oranı ise %16 daha az gözlenmiştir (McMurray ve ark., 2014). *Prospective comparison of ARNI with ARB on Management of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction (PARAMOUNT)* klinik çalışmasında ise ejeksiyon fraksiyonu korunmuş kalp yetmezlikli hastalarda (HFpEF) LCZ696'nın etkinliği bileşiğin içeriğindeki valsartanla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. LCZ696'nın hastalığın karakteristik bulgusu olan büyümüş sol atrium boyutunda daha fazla azalmaya neden olarak *remodeling*i tersine çevirdiği gösterilmiştir. LCZ696 sistolik/ diastolik kan basında 9,3/ 4,9 mmHg azalmaya yol

açarken bu oran tek başına valsartan kullanan hastalarda 2,9/ 2,1 mmHg'dir (Solomon ve ark., 2012).

Hipertansif SHR sıçanlarda oluşturulan kalp yetmezliği modelinde LCZ696 (68 mg/kg) tedavisinin kalp üzerindeki koruyucu ve vasküler fonksiyonu iyileştirici etkisi tek başına valsartan (31 mg/kg)'dan daha üstün bulunmuştur. LCZ696'nın bu olumlu etkilerini miyokardiyal NO biyoyararlanımını artırarak ortaya koyduğu gösterilmiştir (Trivedi ve ark., 2018). SHR sıçanlarda yapılan bir diğer çalışmada LCZ696'nın düşük veya yüksek tuz diyetinden bağımsız olarak kan basıncını düşürücü etkisinin tek başına valsartandan daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte LCZ696 (60 mg/kg), kan basıncını daha etkili bir şekilde düşürmesine paralel olarak, yüksek tuz diyeti alan sıçanlarda koroner arter *remodeling*ini, kardiyak hipertrofiyi, inflamasyonu ve vasküler endotelial disfonksiyonu tek başına valsartan (30 mg/kg)'dan daha çok iyileştirmiştir (Kusaka ve ark., 2015). Miyokard infarktüsü (MI) modeli oluşturulan sıçanlarda, MI'dan bir hafta sonra, dört hafta boyunca LCZ696 (68 mg/kg) tedavisi uygulanmıştır. LCZ696 tedavisinin kardiyak hipertrofi ve fibrozisi azaltarak MI sonrası gelişen kardiyak sol ventrikül disfonksiyonunu ve *remodeling*i iyileştirdiği gösterilmiştir (von Lueder ve ark., 2015). Bununla birlikte tek başına NEPi (AHU377 veya LBQ657) ve ARB (valsartan) tedavileri ile ARNi (valsartan+LBQ657) tedavisinin, Ang-II stimülasyonu ile oluşturulan hipertrofi üzerine karşılaştırmalı etkileri neonatal miyosit ve fibroblast hücrelerinde incelenmiştir. NEPi'nin ön ilaç formu olan AHU377 kardiyak hipertrofi ve fibrozis üzerinde herhangi bir etki göstermezken, ilacın aktif formu LBQ657 fibrozisi etkilemeksizin hipertrofiyi inhibe etmiştir. Tek başına valsartan hem hipertrofi hem de fibrozisi inhibe ederken ilacın LBQ657 ile kombine olarak uygulanması inhibe edici etkisini artırmıştır. Bu veriler, LCZ696'nın kardiyak hipertrofi ve fibrozis üzerindeki olumlu etkisinin tek başına NEPi veya ARB'den daha fazla olduğunu ortaya koymaktadır (von Lueder ve ark., 2015). Başka bir çalışmada ise izoprenalin uygulamasıyla oluşturulan kardiyak hipertrofi ve diastolik disfonksiyon modelinde yedi günlük LCZ696 (60 mg/kg) ve valsartan (30 mg/kg) tedavilerinin hipertrofi üzerinde etkileri gözlenmezken, sadece LCZ696 fibrozisi inhibe etmiştir (Miyoshi ve ark., 2019). Subtotal nefrektomili sıçanlarda sekiz haftalık LCZ696 (30 mg/kg) ve valsartan (15 mg/kg) tedavilerinin

artan sol ventrikül ağırlığı, kardiyak fibrozis ve azalan fraksiyonel kısalma (FS) üzerine olumlu etkileri gözlenmemiştir. Çalışmada ilaçların kardiyoprotektif etkilerinin gözlemlenmemesi, her iki ilacın da patentlerine sahip firma tarafından belirlenen sıçanlarda etkili dozundan (LCZ696: 68 mg/kg; Valsartan: 31 mg/kg) daha az miktarda kullanılmasına bağlanmıştır (Ushijima ve ark., 2017).

PARADIGM-HF klinik çalışmasında, $HbA1c \geq \% 6,5$ ve diabet hastası olan HFrEF'li bireylerde, LCZ696 tedavisi $HbA1c$ seviyesinde sağlanan düşüş $\% 0,26$ iken enalapril tedavisi alan bireylerde bu oran $\% 0,16$ 'dır. Bununla birlikte LCZ696 tedavisi alan bireylerde ilk defa insülin veya oral antidiabetik ilaçlara başlama oranı da enalapril tedavisi alan bireylere göre daha düşüktür. Bu durum, LCZ696'nın glisemik kontrolü sağlamak açısından tek başına enalaprilden daha üstün olduğunu göstermektedir (Seferovic ve ark., 2017). Aynı çalışmada, $HbA1c$ seviyesi ve glisemik durumdan bağımsız olarak LCZ696 tedavisi alan hastalarda hiperkalemi ve renal fonksiyon bozukluğu daha az görülmüştür (Kristensen ve ark., 2016) Obez hipertansif bireylerde, LCZ696 tedavisinin glukoz ve lipid metabolizması üzerinde amlodipin tedavisinden daha olumlu etkileri olduğu kanıtlanmıştır (Jordan ve ark., 2017). DPP-4 enziminin yanı sıra NEP enzimi de endojen GLP-1 ve ekzojen GLP-1 analoglarının yıkımında rol oynamaktadır. LCZ696'nın glisemik kontrolü GLP-1 reseptör sinyalizasyonunu artırmasından kaynaklandığı da düşünülmektedir (Packer, 2018).

HFrEF'li diabetik farelerde LCZ696'nın kalp üzerindeki etkisi ilacın bileşenlerinden biri olan valsartanla karşılaştırılmıştır. LCZ696, TGF- β mRNA ifadenmesini baskılayarak fibrozi valsartan tedavisine oranla daha çok azaltmış ve kardiyak fonksiyonu iyileştirmiştir. İlacın kalp üzerinde bu olumlu etkilerinin bileşiminde bulunan ARB'den çok NEP enzim inhibisyonu ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte LCZ696'nın, NP miktarında neden olduğu artışın ilacın kalp üzerinde antihipertrofik etkisine aracılık ettiği gösterilmiştir (Suematsu ve ark., 2016). ARNi ilaç grubunun bir diğer üyesi olan irbesartan/tiorfan, diabet oluşturulan TGR(mRRN2)27 (Ang-II bağımlı hipertansyon modeli) sıçanlarda kan basıncını içeriğindeki irbesartanla aynı oranda düşürmüştür. Bununla birlikte ARNi tedavisi, kan basıncı üzerindeki etkisinden bağımsız olarak, kalp ağırlığını, proteinüriyi ve

glomerulosklerozisi azaltması açısından tek başına ARB tedavisinden daha üstün bulunmuştur. Elde edilen veriler, diabete bağlı mikrovasküler komplikasyonlar üzerine ARNi grubu ilaçların ARB grubu ilaçlardan daha faydalı olabileceğini düşündürmektedir (Roksnoer ve ark., 2016). LCZ696'nın diabetik kalpteki etkileri hem diabetik fare modelinde hem de yüksek glukozaya maruz bırakılan H9c2 kardiyomyoblast hücre hattında incelenmiştir. LCZ696'nın kardiyak inflamasyonu, oksidatif stresi ve apoptozisi azaltarak diabetik kardiyomiyopatiyi iyileştirdiği gösterilmiştir (Ge ve ark., 2019). ARNi ilaç grubunun bir başka üyesi telmisartan/tiorfanla yapılan çalışmada ise Ge ve arkadaşlarının çalışmasına benzer şekilde, ilacın diabetik kardiyomiyopati üzerindeki olumlu etkilerini inflamatuvar, profibrotik ve apoptotik yolları inhibe ederek gösterdiği ortaya konulmuştur (Malek ve Gaikwad, 2019). ARNi grubu ilaçların diabetik kalpteki olumlu etkilerinin yanı sıra, diabetik retinopati (Prasad ve ark., 2016), diabetik periferik nöropati (Davidson ve ark., 2018) ve diabetik nefropati (Habibi ve ark., 2019) üzerinde tek başına ARB kullanımına kıyasla daha etkili olduğunu gösteren hayvan çalışmaları da bulunmaktadır.

LCZ696 ve ARNi grubu diğer ilaçların sayılan olumlu etkilerinin yanı sıra, NEP enziminin birçok peptidin metabolizmasında rol oynaması ilaç kullanımına bağlı meydana gelebilecek yan etki endişesini artırmaktadır (Malek ve Gaikwad, 2017). Alzheimer hastalığının patogenezi kompleks olmakla birlikte beyinde β -amiloid peptid miktarında artış en önemli belirteçlerdir. NEP enzimi, ACE ve insülin degrade edici enzim beyinde β -amiloid peptid klirensinden sorumlu enzimlerdir. Alzheimer hastalarında NEP geni ifadenin düşük olduğu ve NEP geni çıkarılmış deney hayvanlarında alzheimer tablosunun gözlemlendiği bilinmektedir (Tyler ve Teerlink, 2017). Bu nedenle NEPi ilaçların kullanılması β -amiloid peptid degradasyonunda azalmaya ve beyinde bu peptidin birikiminde artışa neden olmaktadır (Marr ve ark., 2004). Diabetik bireylerin alzheimer hastalığına daha yatkın oldukları düşünüldüğünde (Baglietto-Vargas ve ark., 2016) ARNi grubu ilaçların diabette en çok korkulan yan etkileri alzheimer riskinde artışa neden olmalarıdır. PARADIGM-HF çalışmasından elde edilen verilerde LCZ696 kullanımına bağlı demans ve bilişsel fonksiyonlarda azalmaya dair bir veri elde edilmemekle birlikte (Cannon ve ark.,

2017), ilacın uzun dönemde bilişsel fonksiyon üzerine etkilerinin incelendiği klinik çalışma sonuçlarının 2022 yılında açıklanması beklenmektedir (Singh ve ark., 2017). Her ne kadar LCZ696 ve diğer ARNi grubu ilaçların diyabetik kalp ve böbrek fonksiyonu üzerine olumlu etkileri yapılan prelinik ve klinik çalışmalarda gösterilse de, bu ilaçların diyabetteki etkinliği ve güvenliliğini değerlendirmek amacıyla daha çok hasta bireyden oluşan geniş gruplarda klinik çalışmaların yürütülmesi gerekmektedir (Malek ve Gaikwad, 2017).

Diabete bağlı en önemli morbidite ve mortalite nedeni kardiyovasküler komplikasyonlardır (Einarson ve ark., 2018). İleri aşamada kalp yetmezliğine yol açan diyabetik kardiyomiyopatinin önlenmesinde ve/veya tedavisinde etkili olabilecek ilaçların geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. RAAS'yi hedef alan ilaçların diabete bağlı kardiyovasküler hastalıklarda olumlu etkilerini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Kenny ve Abel, 2019). Kalp yetmezliğinde kompensatuvar mekanizma olarak NP düzeyi de artmaktadır. NP'ler vazodilatör, antifibrotik ve antihipertrofik etkilere aracılık etmektedir. NP'lerin yıkımından sorumlu olan NEP enziminin inhibe edilmesi, NP miktarında artışa bağlı olarak kalp üzerindeki olumlu etkilerinin yanı sıra, glukoz metabolizmasını da iyileştirmektedir. Bu durum NEPi'lerin kardiyovasküler hastalıkların yanında diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıkların tedavisinde etkili bir seçenek olabileceğini düşündürmektedir (Esser ve Zraika, 2019). Valsartan/sakubitril diğer adıyla LCZ696, bir ARB olan valsartanla bir NEPi olan sakubitrilin 1:1 kombinasyonudur. Hem NEPi'lerin hem de ARB'lerin kalpte ve diyabetteki olumlu etkileri düşünüldüğünde LCZ696'nın diabete bağlı gelişen kardiyomiyopatinin tedavisinde kullanılması akla yatkın görünmektedir. Diyabetik kalpte kasılma ve gevşeme yanıtlarının bozulduğu bilinmektedir ve şu ana kadar ilacın diyabetik kalpteki kasılma yanıtları üzerine etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Tüm bu bilgiler ışığında, tez çalışması kapsamında diyabetik kalpte değişen beta adrenerjik yanıtverirlik üzerine valsartan/sakubitril kombinasyonu LCZ696'nın valsartanla karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Gereçler

2.1.1. Cihazlar

%95 oksijen ve %5 karbondioksit içeren gaz karışım tüpü (Kargaz, TÜRKİYE)

3.0 ipek cerrahi iplik (Doğsan Tıbbi Malzeme Sanayi, TÜRKİYE)

Accu-Chek glukometre ve stikleri (Roche, ALMANYA)

Anestezi kafesi (MAY, Commat Ltd., Ankara, TÜRKİYE)

Arietta V60 ultrasound kardiyovasküler sistem (Hitachi Healthcare Inc.,)

Basınç-Hacim (PV) Loop kateteri (Millar Instruments, Houston, ABD)

Basınç-Hacim (PV) Loop data analiz sistemi (SciSense, Kanada)

Buz makinası (Hosizaki Ice Maker, JAPONYA)

Buzdolapları (+4°C, -20°C, Vestel, TÜRKİYE)

Cerrahi makas ve pensler (INOX, ALMANYA)

Çalkalayıcı (IKA®-WERKE, Type OS 10K, ALMANYA)

Çalkalayıcı (MRC, KDS 3016, RC)

Çeşitli cam ve plastik malzemeler (Standart özellikte)

Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler (Eppendorf, ALMANYA; Alfagen, TÜRKİYE)

Derin dondurucu (-80°C) (Nüve, DF 490, TÜRKİYE)

Eldiven (Nitril)

Elektroforez tankı (Bio-Rad, ABD)

Eppendorff tüpler (Isolab, ALMANYA)

Etüv (Blue Pard, PH050A, ÇİN)

Film basma kaseti (Amersham, İNGİLTERE)

Gavaj Kanülü

Güç kaynağı (PowerPac Basic (300V,400mA,75W), Bio-Rad, ABD)

Hassas terazi (Scaltec, SBA 31, ALMANYA; Kern ABJ, ALMANYA)

Havan ve havan eli (porselen)

ISO150-C Güç Kaynağı (Commat, TÜRKİYE)

Kaba terazi (Scaltec, SBA 61, ALMANYA)
Kuru Isıtıcı (Major Science, ABD)
Langendorff Kalp Sistemi (Commat, TÜRKİYE)
Langendorff Sistemi İçin Masterflex L/S Peristaltik Pompa (ABD)
Manyetik Karıştırıcı (Isolab, ALMANYA)
Manyetik karıştırıcı (Isıtıcılı) (Heidolph, Schwabach, ALMANYA)
Mikro plaka (96 kuyucuklu)
Mikroplaka okuyucu (Molecular Devices, SpektraMAX® 190, USA)
Operasyon Masası (Harvard Instrument, ABD)
Otoklav (ALP, Japonya)
Parafilm (Bemis Company, Inc., ABD)
pH metre (Mettler Toledo MP220; İSVİÇRE; Isolab, ALMANYA)
Photonic PL2000 Soğuk Işık Kaynağı
Pipet uçları (Isolab, ALMANYA)
Röntgen filmi (Medical X-ray blue/MXBE film) (Carestream, ABD)
S31 (9-2 MHz) fazlı pediatrik transducer (Hitachi Healthcare Inc.,)
Santrifüj (Hettich, EBA 12, Tuttlingen ALMANYA)
Santrifüj (Soğutmalı) (Hettich, Micro 200R, Tuttlingen, ALMANYA)
Santrifüj (Soğutmalı) (Hettich, Rotina 35R, Tuttlingen, ALMANYA)
Santrifüj (Quick) (HERMLE, Z 160 M, Wehingen, ALMANYA)
Sonikatör (BANDELIN Sonoplus, HD 2200, Berlin, ALMANYA)
Sıvı Azot Tankı (Kargaz, TÜRKİYE)
Sirkülatörlü Su Banyosu (Commat, TÜRKİYE)
Solunum Anestezi Cihazı (Harvard Apparatus, ABD)
Steiert Tipi Yatay Süperfüzyon Sistemi (Hugo Sachs, ALMANYA)
Steiert Tipi Yatay Süperfüzyon Sistemi İçin Sıcaklık Kontrol Cihazı (Hugo Sachs, ALMANYA)
Stimülatör (Grass S44, ABD)
TS410 Akımölçer (Transonic, ABD)
Transducer Amplifier (MAY, BA-97, Commat Ltd., Ankara, TR)
Transfer seti (Bio-Rad, ABD)
Vakumlu süzme seti (Erlen, vakum başlığı, süzme haznesi, süzme seti kısıkaçı)

Vakumlu Süzme Cihazı (Velp Scientifica, İTALYA)

Veri Kayıt ve Analiz Sistemi (MP35 Data Acquisition System, Biopac-System Inc, ABD)

Veri Kayıt ve Analiz Sistemi (MP100 Data Acquisition System, Biopac-System Inc, ABD)

Vortex (Velp Scientifica, İTALYA)

Yatay Süperfüzyon Sistemi İçin Peristaltik Pompa (Ismatec, ALMANYA)

2.1.2. Kimyasal Malzemeler

Akrilamid/Bis Solüsyonu (%30, 29:1) (Bio-Rad, ABD)

Amonyum persülfat (APS) (Bio-Rad, ABD)

Antikor (primer) (GAPDH (14C10), CST2118S, Cell signaling, ABD)

Antikor (primer) (PLN, CST8495, Cell signaling, ABD)

Antikor (primer) (p-PLN (PLN^{ser16/thr17}), CST8496, Cell signaling, ABD)

Antikor (primer) (SERCA2a, CST4388, Cell signaling, ABD)

Antikor (sekonder) (Antirabbit, CST7074, Cell signaling, ABD)

Artırılmış kemilüminesans (ECL) solüsyonu (Clarity, Bio-Rad, ABD)

Bikinkoninik asit (BCA) protein miktar tayini kiti (Thermo Scientific, Pierce™, ABD)

Bovine serum albümin (BSA) (Equitech Bio, Inc., ABD)

Bromfenol blue (Sigma-Aldrich, ABD)

CL 316,243(Sigma Aldrich, ABD)

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich, ABD)

Dithiothreitol (DTT) (Bio-Rad, ABD)

Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) (Sigma Aldrich, ABD)

Forskolin (Sigma Aldrich, ABD)

Gliserol (Sigma-Aldrich, ALMANYA)

Glisin (Bio-Rad, ABD)

Glukoz monohidrat (Sigma Aldrich, ABD)

Heparin (Heparinum, Pharmada, TÜRKİYE)

Hidrojen klorür (Merck, ALMANYA)

İnsülin ve NT-proBNP ELISA kitleri (Shanghai Sunred Biological Technology Co., ÇİN)

İzofluran (ADEKA, TÜRKİYE)

İzoprenalin (Sigma Aldrich, ABD)

İzopropanol (Sigma Aldrich, ALMANYA)

Kalsiyum klorür dihidrat (Sigma Aldrich, ABD)

Laemmli (6X) çözeltisi

Magnezyum klorür heptahidrat (Sigma Aldrich, ABD)

Membran strip solüsyonu (Nyztech, PORTEKİZ)

Metanol (Merck, Sigma Aldrich, ALMANYA)

Nitroselüloz (NS) membran (Bio-Rad, ABD)

Polivinilidin florür (PVDF) membran (Bio-Rad, ABD)

Potasyum fosfat monobazik (Sigma-Aldrich, ABD)

Potasyum klorür (Sigma Aldrich, ABD)

Proteaz inhibitör kokteyl (Sigma-Aldrich, ABD)

Protein ladder (PageRuler, Thermo Fisher, ABD)

Radyoimmünopresipitasyon tampon çözeltisi (RIPA) (Sigma-Aldrich, ABD)

Röntgen filmi banyo developer solüsyonları (Konax, TÜRKİYE)

Röntgen filmi banyo fikser solüsyonları (Konax, TÜRKİYE)

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Bio-Rad, ABD)

Selüloz Asetat Filtre (0.45µm, Sartorius AG, ALMANYA)

Sıçan yemi (Altromin, ALMANYA ve ARDEN Araştırma & Deney, TÜRKİYE)

Sodyum bikarbonat (Sigma Aldrich, ABD)

Sodyum hidroksit (Sigma Aldrich, ABD)

Sodyum klorür (Sigma Aldrich, ABD)

Sodyum ortovanadat (Na₂VO₃)

Streptozosin (Sigma Aldrich, ABD)

Valsartan (Novartis, İSVİÇRE)

Valsartan/sakubitril (LCZ696) (Novartis, İSVİÇRE)

Western Blot Ayırıcı Jel Solüsyonu pH 8,8 (Bio-Rad, ABD)

Western Blot Yükleme Jel Solüsyonu pH 6,8 (Bio-Rad, ABD)

Trigliserid ve kolesterol ELISA kitleri (Analytic Diagnostic Systems, TÜRKİYE)

Trisin yükleme    eltisi (2x)
Trisle tamponlanmış salin (TBS) (Bio-Rad, ABD)
Tetrametiletilendiamin (TEMED) (Bio-Rad, ABD)
Tris/Glisin/SDS (TGS) tampon    eltisi (Bio-Rad, ABD)
Tris (Bio-Rad, ABD)
Trisodyum sitrat dihidrat (Merck, ALMANYA)
Tween 20 Solüsyonu (Bio-Rad, ABD)

2.2. Kullanılan Yöntemler

2.2.1. Deney Hayvanları

Bu  alışmada Bilkent Üniversitesi Deney Hayvanları  nitesi'nden alınan 95 adet, dört haftalık (50-150 g) erkek Sprague-Dawley sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Deney Hayvanları  nitesinde 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık ortamda (07:00-19:00 saatleri arası aydınlık, 19:00-07:00 saatleri arası karanlık), 22 1  C sıcaklığa ve %30-70 nem oranına sahip odalarda barındırılmıştır. İki hafta süre ile sıçanların barınma ortamına alışmaları sağlanmıştır. Alışma süresinin ardından sıçanlar rastgelleme (randomizasyon) yöntemi ile dört gruba ayrılmıştır.

Hayvan grupları:

1. Kontrol (K)
2. Diabetik (D)
3. Valsartan/sakubitril tedavili diabetik (VS)
4. Valsartan tedavili diabetik (V)

2.2.2. Diabetin Oluşturulması

İki haftalık alışma dönemi sonrasında kontrol sıçanlar %10 kilokalorilik (kcal) kısmının yağdan karşılandığı kontrol yemle diğer gruptaki sıçanlar ise enerjinin %45 kcal kısmının yağdan karşılandığı özel bir yemle dört hafta boyunca beslenmiştir. Sonrasında yüksek yağlı yemle beslenen sıçanlara pH 4,5 sitrat tamponu içerisinde çözünmüş düşük doz [30 mg/kg, intraperitoneal (i.p)] STZ injeksiyonu yapılmıştır. Kontrol grubundaki sıçanlara ise hacimce eşit miktarda pH 4,5 sitrat tamponu i.p olarak uygulanmıştır. İnjesiyondan 72 saat sonra rastgele ölçülen kan şekeri 200 mg/dL'nin üzerinde olan sıçanlar diabetik olarak kabul edilmiş ve 10 hafta boyunca kardiyovasküler komplikasyonların gelişmesi beklenmiştir.

2.2.3. LCZ696 ve Valsartan Tedavisi

10 haftalık diabet süreci sonunda diabetik sıçanların bir kısmı dört hafta boyunca valsartan/sakubitril (LCZ696) (68mg/kg/gün, oral gavaj, günde bir kez, saat 10:30) ve valsartan (31 mg/kg/gün, oral gavaj, günde bir kez, saat 10:30) ile tedavi edilmiştir. valsartan/sakubitril 34 mg/mL, valsartan 15,5 mg/mL konsantrasyonda hazırlanıp 14 güne kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.4. Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT)

Tedavinin üçüncü haftasında 12 saat boyunca aç bırakılan sıçanlara 2 g/kg glukoz yüklemesi yapılmıştır. Sonrasında belirli aralıklarla [0, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda (dk)] kuyruk veninden kan şekeri ölçümü yapılmıştır. Kuyruk veninden alınan kan örnekleri EDTA'lı tüplere alınarak plazma ayrılmıştır. Plazma örnekleri sonrasında insülin değerlerinin ölçümünde kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırılmıştır. İnsülin duyarlılığının göstergesi olan *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance* (HOMA-IR) indeksi=[(açlık kan şekeri (mmol/L) x açlık insülin seviyesi (μIU/mL))/22,5] formülüyle hesaplanmıştır (Bowe ve ark., 2014).

2.2.5. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçülmesi

Haftalık kan şekeri ölçümü, her hafta aynı gün ve saatte olmak üzere, sıçanların kuyruklarından alınan kanla şeker ölçüm cihazı ve stikleri yardımıyla yapılmıştır. Plazma insülin, NT-proBNP, kolesterol ve trigliserid seviyeleri *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) kitleri ile kit kullanım kılavuzunda belirtilen şekilde gerçekleştirilip 450 nm’de spektrofotometrik okuma yapılmıştır.

2.2.6. İn vivo Kalp Deneyleri

2.2.6.1. İn vivo Kateterizasyon Deneyi

Anestezi uygulamasından 10 dk önce sıçanlara heparin (3000 U/kg, i.p) enjeksiyonu yapılmıştır. İzofluran (%2 infüzyon) anestezisi altındaki sıçanlar vücut ısılarının 37°C’de sabit tutulmasını sağlayan, ısıtmalı özel operasyon masasına yatırılıp sabitlenmiştir. Sıçanların sağ karotid arteri izole edilmiş ve artere küçük bir kesi atılmıştır. *İn vivo* basınç-hacim kateteri bu kesiden damarın içine takılmış ve bir süre karotid basıncı okunarak kaydedilmiştir. Sonrasında kateter yavaşça aşağı doğru itilerek sol ventrikülün içine yerleştirilmiştir. 10 dk stabilizasyon süresinin ardından elde edilen *loop*lar, sisteme ait veri kayıt sistemine kayıt edilmiştir. Elde edilen *loop*lardan birçok bazal hemodinamik parametre [sistol sonu basınç (SSB), diyastol sonu basınç (DSB), sistol sonu hacmi (SSH), diyastol sonu hacmi (DSH), atım hacmi (AH), kardiyak debi (KD), kalp atım hızı (KAH), kasılma hızı (dp/dt_{max}), gevşeme hızı (dp/dt_{min}), izovolumik gevşeme sabiti (Tau)] hesaplanmıştır.

Bazal değerler ölçüldükten sonra sıçanların karın bölgeleri açılmış ve *vena cava inferior*’a beş saniyelik basılar uygulanarak ard yük (*preload*) bağımsız parametreler [ard yük bağımsız atım gücü (PRSW), sistol sonu basınç hacim ilişkisi (ESPVR), diyastol sonu basınç hacim ilişkisi (EDPVR)] ölçülmüş ve analiz edilmiştir.

2.2.6.2. *İn vivo* Ekokardiyografi Deneyi

Ekokardiyografi deneyleri tedaviyi takip eden ikinci ve üçüncü haftalarda uygulanmıştır. Sıçanlar, izofluran (%2 infüzyon) ile anestezi altına alınmıştır. Sol lateral dekübit pozisyona getirilerek, Arietta V60 ultrasound kardiyovasküler sistem cihazı ve S31 (9-2 MHz) fazlı pediatrik transducer kullanılarak yüksek çözünürlükte kardiyak tarama yapılmıştır. *Transducer* iletim hızı 10 MHz, derinliği 2,5 cm ve çerçeve hızı saniyede 225 çerçeve olarak ayarlanıp, papiller kas seviyesinde elde edilen standart iki boyutlu (2D) kısa eksenli görüntüler daha sonra yapılacak olan analizler için kaydedilmiştir. Sol ventriküler boyut M-mode ekokardiyografi ile orta-papiller seviyenin kısa eksen görünümü ile ölçülmüş ve sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu (EF) Teicholz yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. DAS-RS1echoLAB (Hitachi Healthcare Inc), radyal gerilme (Srad), gerilme oranı (SRrad) ve çevresel gerilme oranı (SRcirc) analizi için kullanılmıştır. 2D-gerilme programı ile, ventriküler silueti altı bölüme ayırdıktan sonra, B-mode görüntülerinde gözlemlenen güçlü reflektörlerin hareketi, çerçeveden çerçeveye izlenmiştir. Yapılan ekokardiyografi analizi ile sıçanların kardiyak parametreleri (Çizelge 3.5) hesaplanmıştır.

2.2.7. *İn vitro* Kalp Deneyleri

2.2.7.1. *İn vitro* İzole Papiller Kas Deneyi

İn vivo kateterizasyon deneyleri sonrasında, anestezi altındaki sıçanların kalpleri izole edilerek, içinde Krebs-Henseleit çözeltisi [NaCl 120; NaHCO₃ 25; Glukoz 10; KCl 4,8; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,25; CaCl₂ 1,25 (mmol/L)] bulunan küçük cam beherlere konulmuştur. Tartıldıktan sonra içerisinde Krebs-Henseleit çözeltisi bulunan ve sürekli oksijenlendirilen petriye alınan kalp dokusu orta kısmından açılıp iğnelenmiş ve sol ventrikül papiller kası izole edilerek yatay organ banyosuna asılmıştır. Deney boyunca Krebs-Henseleit çözeltisinin sıcaklığı 30°C’de ve %95 O₂ ve %5 CO₂ gaz karışımı ile havalandırılarak pH’sı 7,4’te sabit tutulmuştur. Yatay

superfüzyon sistemine asılan papiller kas stimülatör ile uyarılarak (0,6 Hz, 2ms, eşik voltaj değerinin 2 katı) ve 5 ml/dk hızda Krebs-Henseleit çözeltisi ile perfüze edilmiştir. Bu süre sonunda 10 μ m'lik artışlar ile papiller kas gerdirilerek kasın geriminin en fazla olduğu değer olan L_{max} değeri bulunmuştur. Sonrasında bu değer % 90'ı alınarak papiller kas bu gerimde sabitlenmiştir. Yaklaşık bir saatlik stabilizasyon süresi sonunda selektif olmayan β -AR agonisti izoprenalin (0,1 nM-10 μ M) ile kümülatif konsantrasyon yanıt eğrisi çıkarılmıştır. Ardından bazal değere ulaşıncaya kadar Krebs-Henseleit çözeltisi ile yıkanan preparat, AS aktivatörü forskolinle (3 μ M) uyarılarak konsantrasyon yanıt eğrisi elde edilmiştir.

2.2.7.2. *In vitro* Langendorff Kalp Preparasyonu Deneyi

%2 izofluran anestezisi altında sıçanların kalpleri çıkarılarak buzlu Krebs-Henseleit çözeltisine [NaCl 120; NaHCO₃ 25; Glukoz 10; KCl 4,8; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,25; CaCl₂ 1,25 (mmol/L)] konulmuş ve zaman kaybetmeksizin aortadan Langendorff kanülüne takılarak çevresindeki dokulardan temizlenmiştir. Kalpler ilk önce sabit basınç altında çalıştırılmış ve sabit basınçta ihtiyaç duydukları miktarda Krebs-Henseleit çözeltisi ile perfüze edilmiştir. Deney süresince Krebs-Henseleit çözeltisinin sıcaklığı sirkülatörlü su banyosu ile 37°C'de, pH'sı ise %95 O₂ ve %5 CO₂ gaz karışımı ile 7,4'de sabit tutulmuştur. Kalbin sol ventrikül fonksiyonunu ölçmek üzere bir ucu 'basınç *transducer*'ına bağlı olan streç filmten yapılmış balon boş şekilde sol ventrikül içine yerleştirilmiştir. Balonun içindeki hacim, sol ventrikül diyastol sonu basıncı (LVEDP), hacmin kademeli artırılması ile çıkarılan *frank-starling* eğrisine uygun olarak ayarlanmıştır. Sonrasında apekse elektrot yerleştirilerek kalpler dkda 300 atım olacak şekilde uyarılmıştır. 30 dk stabilizasyon süresi sonrasında sabit akımda selektif β_3 -AR agonisti CL316,243 (10⁻⁵ μ M-1 μ M) ile konsantrasyon yanıt eğrisi elde edilmiştir. Kalbin fonksiyonunu değerlendirmek için sol ventrikül içi gelişen basınç (SVGB), dP/dtmax ve dP/dtmin değerleri kaydedilip sonrasında analizleri yapılmıştır.

2.2.8. Western Blot Deneyleri

Sıvı azot içerisinde dondurulduktan sonra -80°C 'de saklanan sol ventrikül dokuları, sıvı azot ile toz edilip içinde RIPA tampon çözeltisi (1 ml), fosfataz inhibitörü sodyum ortovanadat (Na_2VO_3 , 200mM) ve proteaz inhibitör kokteyli (1:100) olan dibi konik tüpe alınmıştır. Ultrasonik homojenizatör yardımıyla homojenize edildikten sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de iki saat süreyle çalkalanarak ajitasyon sağlanmıştır. Örnekler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 12000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Alınan supernatant kısmı küçük parçalara (100 μl) bölünmüş ve -80° 'de saklanmıştır. Bu lizatların protein miktar tayinleri BCA yöntemi ile yapılmıştır.

Sol ventrikül dokusundan elde edilen lizatların üzerine *Laemmli* (6X) çözeltisi, her örnekte eşit miktarda protein olacak miktarda eklenip 37°C 'de 30 dk ısıtılarak protein denatürasyonu sağlanmıştır ve örnekler jele yüklenmeye hazır hale getirilmiştir.

Örneklerin elektroforezinde kullanılan jellerin konsantrasyonu bakılacak proteinin ağırlığına göre belirlenmiştir. Bu amaçla çalışmamızda ağırlıklı olarak %10 konsantrasyonda hazırlanmış jel kullanılmıştır. Elektroforezde kullanılan jeller örneklerin molekül ağırlığına göre ayrılmasını sağlayan ayırıcı jel (Çizelge 2.1) ve örneklerin yüklendiği yükleme jeli (Çizelge 2.2) olmak üzere hazırlanmıştır.

Çizelge 2.1. Ayırıcı jel formülasyonu

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

Çizelge 2.2. Yükleme jel formülasyonu

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

Örnekler jele yüklendikten sonra 30 dk boyunca 30 Volt (V)'ta, sonrasında 90 dk boyunca 120 V'de elektroforez edilerek yüklenen örneklerin jelde molekül ağırlıklarına göre ayrılmaları sağlanmıştır.

PLN ve p-PLN (fosforile fosfolamban) proteinleri küçük molekül ağırlıklı proteinler oldukları için klasik jel ve elektroforez tampon çözeltileri bu proteinlerin tayininde kullanmak için elverişli değildir. PLN ve p-PLN protein tayini için, sol ventrikül dokusundan elde edilen lizatların üzerine trisin yükleme çözeltisi (2x) her örnekte eşit miktarda protein olacak miktarda eklenip 100°C'de beş dk ısıtılarak protein denatürasyonu sağlanmıştır. Numunelerin yüklenmesi için trisin jeli (Çizelge 2.3 ve 2.4) ve elektroforez için 1X anot/katot tampon çözeltileri (Çizelge 2.5 ve 2.6) kullanılmıştır.

Çizelge 2.3. Trisin ayırıcı jel formülasyonu

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

Çizelge 2.4. Trisin yükleme jel formülasyonu

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

Çizelge 2.5. Katot tampon çözeltisi formülasyonu

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

Çizelge 2.6. Anot tampon çözeltisi formülasyonu

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

Elektroforez işlemi sonrasında jeller alınarak transfer tamponunda (Çizelge 2.7) yıkanmıştır. Sünger, filtre kağıdı, jel, membran, filtre kağıdı ve sünger üst üste yerleştirilerek sandviç haline getirilmiş ve bu sandviçler transfer kasetlerine yerleştirilmiştir. Çalışılacak proteine uygun olarak PVDF veya NS membran seçilmiştir. Hazırlanan kasetler tanka oturtulmuş ve buz kalıbı da konularak tank taze hazırlanmış transfer tamponuyla doldurulmuştur. Transfer işlemi karıştırıcı üzerinde ve soğukta gerçekleştirilmiştir. Yüklenen protein miktarına bağlı olarak transfer işlemi 100 V'de iki saat (10 µg protein), üç saat (45 µg protein) veya dört saat (100 µg protein) yapılmıştır. Bu işlem ile jeldeki örneklerin membrana transferi sağlanmıştır.

Çizelge 2.7. Transfer tampon çözeltisi formülasyonu

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

Transfer işlemi sonunda alınan membranlar TBST (%1 Tween 20 içeren 1X TBS çözeltisi) ile yıkandıktan sonra, spesifik olmayan antikor bağlanmalarını önlemek için %5 BSA içeren TBST ile bir saat boyunca muamele edilmiştir. Bloklama işlemi oda sıcaklığında ve çalkalayıcı üzerinde yapılmıştır. Bloklama işlemi tamamlanan membranlar TBST çözeltisi ile oda sıcaklığında çalkalayıcıda üç kez 10'ar dk boyunca yıkanmıştır.

Çalışılan proteine göre seçilen primer antikor %5 BSA içeren TBST içinde belirlenen dilüsyonda (Çizelge 2.8) hazırlanmıştır. Membranlar bu şekilde primer antikor ile +4°C'de bütün gece çalkalmıştır. Ertesi gün membranlar primer antikor çözeltisinden alınıp TBST çözeltisi ile oda sıcaklığında üç kez 10'ar dk boyunca çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır.

Çizelge 2.8. Primer antikorlar ve dilüsyonları

Primer antikor	Dilüsyon
GAPDH	1/5000
SERCA2a	1/2000
PLN	1/2000
p-PLN (PLN ^{ser16/thr17})	1/1000

Çalışılan proteine ve kullanılan primer antikora uygun olan sekonder antikor seçilerek %5 BSA içeren TBST içinde uygun dilüsyonda (Çizelge 2.9) içinde hazırlanmıştır. Membranlar bu sekonder antikor ile +4°C'de bir buçuk saat boyunca çalkalanmış, sonrasında TBST çözeltisi ile oda sıcaklığında üç kez 10'ar dk, bir kez 10 dk TBS çözeltisi ile çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır.

Çizelge 2.9. Sekonder antikorlar ve dilüsyonları

Sekonder antikor	Dilüsyon
GAPDH (Antirabbit)	1/5000
SERCA2a (Antirabbit)	1/5000
PLN (Antirabbit)	1/2000
p-PLN (PLN ^{ser16/thr17}) (Antirabbit)	1/2000

Yıkanan membranların üzerine 1 ml ECL çözeltisi (reaktif A ve reaktif B'nin 1:1 karışımı ile taze olarak hazırlanmıştır) eklenmiş ve 30 sn boyunca, karanlıkta membran ile muamele edilmiştir. ECL uygulanan membranlar kasetin içine konulmuş ve karanlık odada görüntü röntgen filmine basılmıştır. Basma süresi ilgili proteine göre 1 sn - 15 dk arasında uygulanmıştır. Film önce *developer* çözeltisinde 20 sn, sonra *fikser* çözeltisinde 20 sn tutulmuştur. Son olarak su ile yıkanıp kurutulan filmdeki görüntüler tarayıcıda taranıp, Image J programı yardımıyla bilgisayarda analiz edilmiştir.

2.2.9. İstatistiksel Analiz

Araştırmada elde edilen sonuçların analizi, GraphPad Prism[®] (sürüm 8.3) programıyla yapılmıştır. Deneyler sonucunda elde edilen aykırı değerlerin değerlendirme dışında tutulması için, aykırı değerlerin ortalamanın iki Standart sapma (SD) katı dışında olması kuralı uygulanmıştır. Bu yöntem elde edilecek anlamlılık yanıtlarını olumsuz etkilemekle birlikte, sonuçların değerlendirilmesinde yanlılığı (*bias*) önlemektedir. Veriler ortalama $\pm$ SD ile ifade edilmiştir. Gruplar arası karşılaştırma tek-yönlü ANOVA ve Bonferroni *post-hoc* testi ile yapılmış olup, istatistiksel analiz $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir.

2.2.10. Yazım ve Grafiklerin Oluşturulması

Tez çalışmasında yazımında Microsoft Office Word[®] programı, kaynakçanın düzenlenmesinde End Note[®] (sürüm 9) programı, şekillerin düzenlenmesinde Paint

programını kullanılmıştır. Grafikler, GraphPad Prism® (sürüm 8.3) programında oluşturulmuştur. Konsantrasyon-yanıt grafiği dışındaki diğer grafiklerin saçılım (*scatter plot*) grafiği şeklinde verilmesi tercih edilmiştir. Bu şekilde dataaların dağılımının şeffaf bir şekilde gösterilmesi hedeflenmiştir.

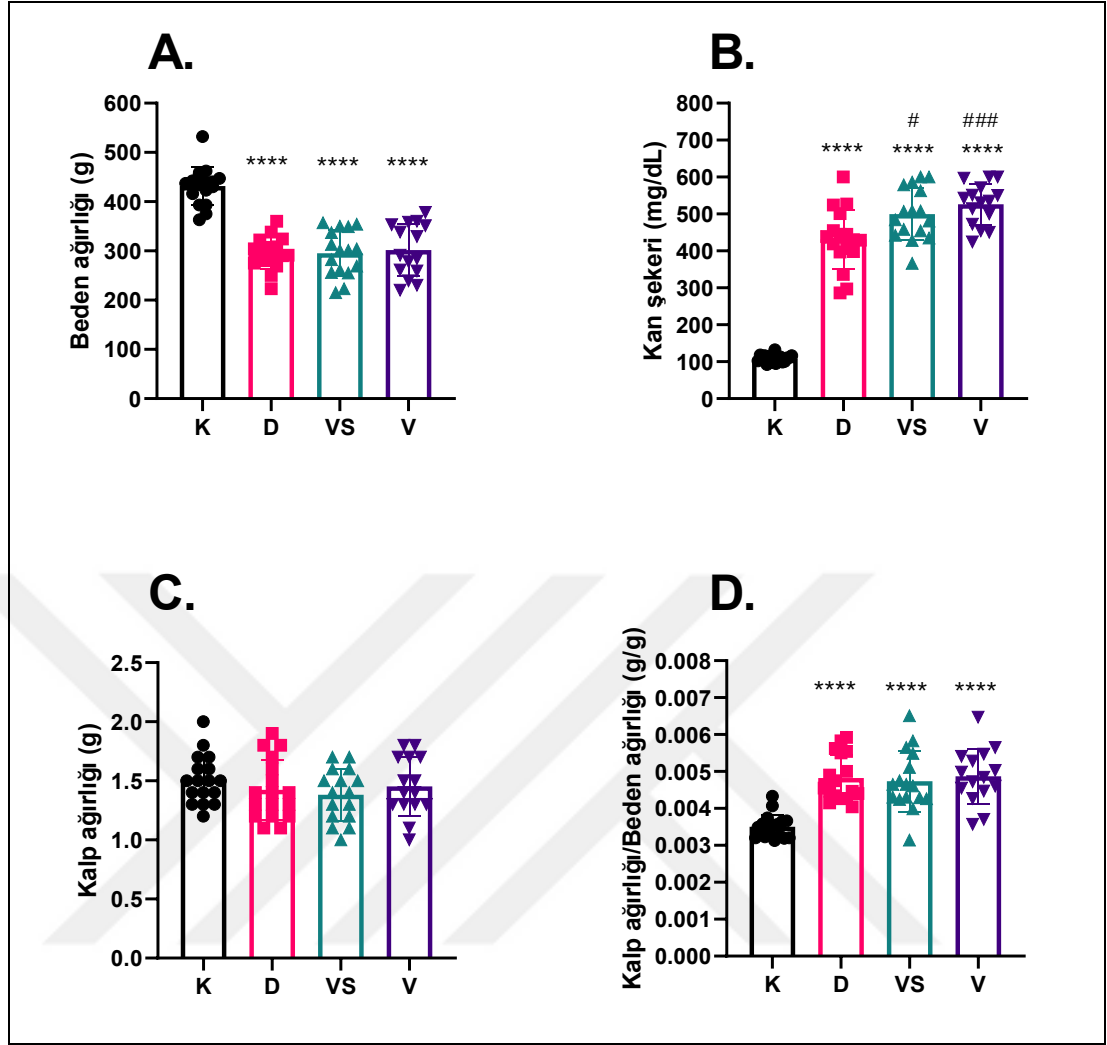


3. BULGULAR

3.1. Deney Hayvanlarının Genel Özellikleri

3.1.1. Ölüm Anı Beden Ağırlığı, Kalp Ağırlığı, Kan Şekeri Düzeyi

Deney sürecinin sonunda yüksek yağ diyeti ve düşük doz STZ alan diabetik sıçanların beden ağırlığı kontrol sıçanlara oranla anlamlı olarak azalmıştır. Diabetik sıçanlara uygulanan valsartan ya da valsartan/sakubitril kombine tedavisi beden ağırlığında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (K: $431,71 \pm 38,71$; D: $295,53 \pm 32,48$; VS: $295,44 \pm 46,34$; V: $301,93 \pm 53,27$) (g) (Şekil 3.1A). Diabetik sıçanlarda kan şekeri düzeyi beklenildiği gibi belirgin olarak artmıştır. Her iki tedavi grubunda da diabetik gruba oranla ölüm anı kan şekeri düzeyleri anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (K: $108,35 \pm 10,09$; D: $431,41 \pm 80,38$; VS: $499,94 \pm 69,77$; V: $526,07 \pm 56,51$) (mg/dL) (Şekil 3.1B). Sıçanların kalp ağırlıkları gruplar arasında farklılık göstermezken (K: $1,51 \pm 0,21$; D: $1,43 \pm 0,25$; VS: $1,38 \pm 0,22$; V: $1,45 \pm 0,25$) (g) (Şekil 3.1C) kardiyak hipertrofinin bir belirteci olan kalp ağırlığının beden ağırlığına oranı diabetik sıçanlarda anlamlı olarak artmıştır. Ne var ki, her iki tedavi yaklaşımının da bu oran üzerinde olumlu bir etkisi bulunmamıştır (K: $0,0035 \pm 0,0003$; D: $0,0048 \pm 0,0006$; VS: $0,0047 \pm 0,0008$; V: $0,0049 \pm 0,0007$) (g/g) (Şekil 3.1D).



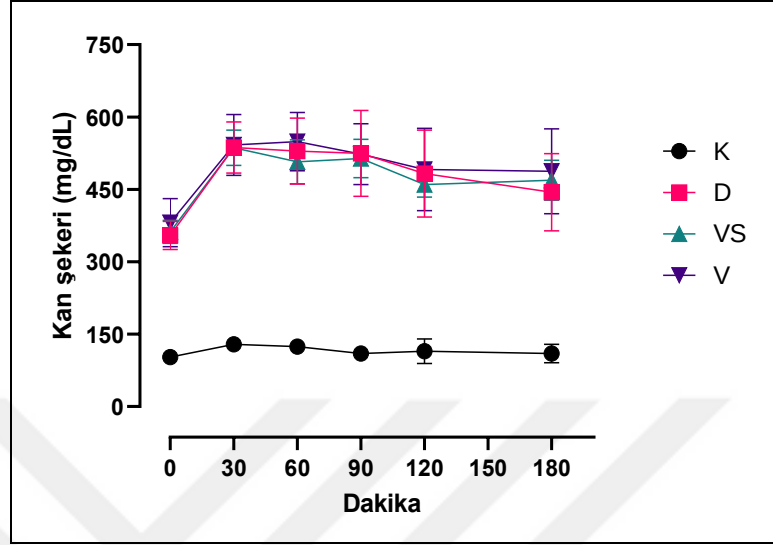
Şekil 3.1. Sıçanların genel özellikleri

A. Ölüm anı beden ağırlığı; **B.** Ölüm anı kan şekeri; **C.** Kalp ağırlığı; **D.** Kalp ağırlığının beden ağırlığına oranı. K, Kontrol (n=17); D, Diabetik (n=17); VS, Valsartan/sakubitril tedavili diabetik (n=16); V, Valsartan tedavili diabetik (n=15). ****, $p < 0,0001$ kontrole göre anlamlılık. #, $p < 0,05$; ###, $p < 0,001$ diabete göre anlamlılık.

3.1.2. OGTT Kan Şekeri Düzeyleri ve Açlık Plazma İnsülin Düzeyi ile HOMA-IR Değerleri

Sıçanlara 12 saatlik açlık süresinden sonra yapılan 2 g/kg glukoz yüklemesi sonrasında kontrol, diabetik ve valsartan/sakubitril tedavili diabetik gruplarda en yüksek kan şekeri değeri 30. dakikada, valsartan tedavili diabetik grupta ise 60. dakikada ölçülmüştür. OGTT sırasında bütün dakikalarda ölçülen kan şekeri düzeyleri

kontrol grubuna oranla hem diabetik hem de tedavi gruplarında anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (Şekil 3.2 ve Çizelge 3.1).



Şekil 3.2. OGTT kan şekeri değerlerinin zamana göre değişimi

K, Kontrol (n=8); D, Diabetik (n=7); VS, Valsartan/sakubitril tedavili diabetik (n=8); V, Valsartan tedavili diabetik (n=9).

Çizelge 3.1. Sıçanların OGTT sırasında ölçülen kan şekeri değerleri

K, Kontrol (n=8); D, Diabetik (n=7); VS, Valsartan/sakubitril tedavili diabetik (n=8); V, Valsartan tedavili diabetik (n=9). ****, $p < 0,0001$ kontrole göre anlamlılık.

	K (n=8)	D (n=7)	VS (n=8)	V (n=9)
0. dk kan şekeri (mg/dL)	102,38 ± 7,95	354,71 ± 29,25****	362,13 ± 24,19****	381,33 ± 50,14****
30. dk kan şekeri (mg/dL)	128,88 ± 10,36	536,86 ± 53,06****	536,13 ± 36,72****	542,00 ± 63,31****
60. dk kan şekeri (mg/dL)	124,13 ± 13,16	529,14 ± 68,54****	507,25 ± 45,60****	549,11 ± 60,58****
90. dk kan şekeri (mg/dL)	110,13 ± 12,81	524,86 ± 89,11****	513,88 ± 40,02****	523,00 ± 63,04****
120. dk kan şekeri (mg/dL)	114,63 ± 25,49	482,57 ± 90,48****	460,13 ± 25,96****	491,22 ± 85,40****
180. dk kan şekeri (mg/dL)	109,88 ± 18,94	444,00 ± 79,86****	469,13 ± 41,35****	487,33 ± 88,40****

OGTT öncesi ölçülen açlık kan şekeri değerleri kontrol gruba oranla diabetik ve tedavi gruplarında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Açlık insülin düzeyleri arasında gruplar arasında bir farklılık gözlenmemesine karşın insülin duyarlılığının bir göstergesi olan HOMA-IR indeksi diabetik grupta anlamlı olarak artmıştır. Bununla birlikte her iki tedavi yaklaşımının da insülin duyarlılığı üzerinde iyileştirici etkisi bulunmamaktadır (Çizelge 3.2).

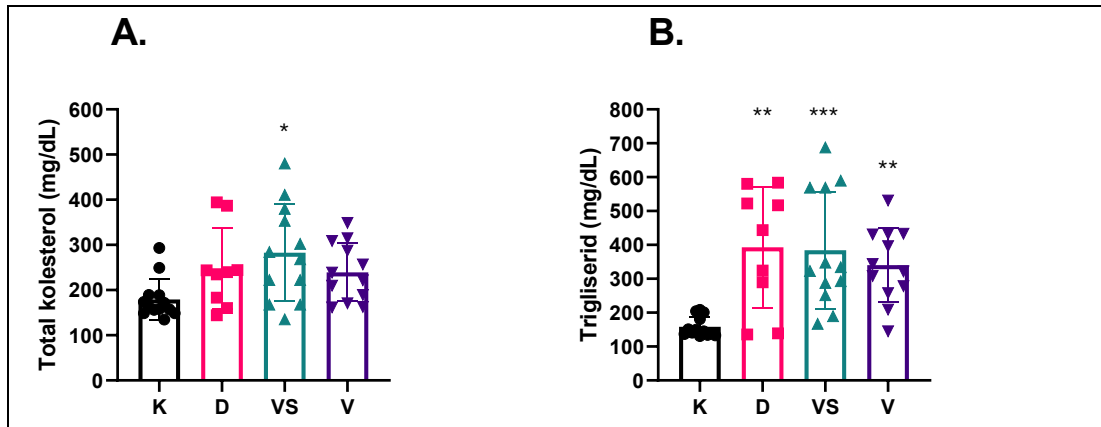
Çizelge 3.2. Sıçanların OGTT öncesi ölçülen açlık kan şekeri değerleri, açlık insülin düzeyleri ve HOMA-IR indeksi değerleri

K, Kontrol (n=5); D, Diabetik (n=5); VS, Valsartan/sakubitril tedavili diabetik (n=6); V, Valsartan tedavili diabetik (n=5). ****, p<0,0001 kontrole göre anlamlılık.

	K (n=5)	D (n=5)	VS (n=6)	V (n=5)
Açlık kan şekeri (mg/dL)	102,00 ± 8,34	350,40 ± 27,49****	365,00 ± 24,39****	400,20 ± 62,54****
Açlık insülin düzeyi (mIU/L)	10,21 ± 0,77	10,77 ± 0,96	10,30 ± 0,86	10,36 ± 0,63
HOMA-IR	2,56 ± 0,20	9,27 ± 0,45****	9,29 ± 1,18****	10,22 ± 1,74****

3.1.3. Plazma Total Kolesterol ve Trigliserid Düzeyleri

Ölüm anında toplanan plazmadan ölçülen total kolesterol düzeylerinde diabetik sıçanlarda ve valsartan tedavili diabetik sıçanlarda kontrole oranla anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Bununla birlikte valsartan/sakubitril tedavili sıçanlarda total kolestrol düzeyi kontrol sıçanlardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (K: 179,41 ± 44,51; D: 247,90 ± 89,08; VS: 282,83 ± 106,99; V: 239,27 ± 64,26) (mg/dL) (Şekil 3.3A). Plazma trigliserid düzeyleri diabetik sıçanlarda kontrol sıçanlara oranla anlamlı olarak yükselirken, tedavi ajanlarının trigliserid seviyeleri üzerinde iyileştirici bir etkisi bulunmamaktadır (K: 158,12 ± 29,40; D: 392,83 ± 177,60; VS: 384,13 ± 173,41; V: 340,61 ± 109,67) (mg/dL) (Şekil 3.3B).

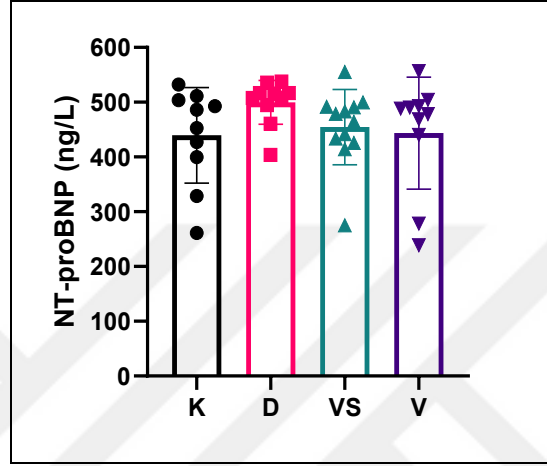


Şekil 3.3. Sıçanların plazma lipid düzeyleri

A. Plazma total kolesterol düzeyi; **B.** Plazma trigliserid düzeyi. K, Kontrol (n=13); D, Diabetik (n=9); VS, Valsartan/sakubitril tedavili diabetik (n=12); V, Valsartan tedavili diabetik (n=12). *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001 kontrole göre anlamlılık.

3.1.4. Plazma NT-proBNP Düzeyleri

Ölüm anında toplanan plazmadan ölçülen NT-proBNP düzeyleri diabetik grupta görece artmakla birlikte, gruplar arası anlamlı farklılık gözlenmemiştir (K: $439,57 \pm 87,39$; D: $499,79 \pm 40,07$; VS: $454,53 \pm 68,53$; V: $443,55 \pm 102,25$) (ng/L) (Şekil 3.4).



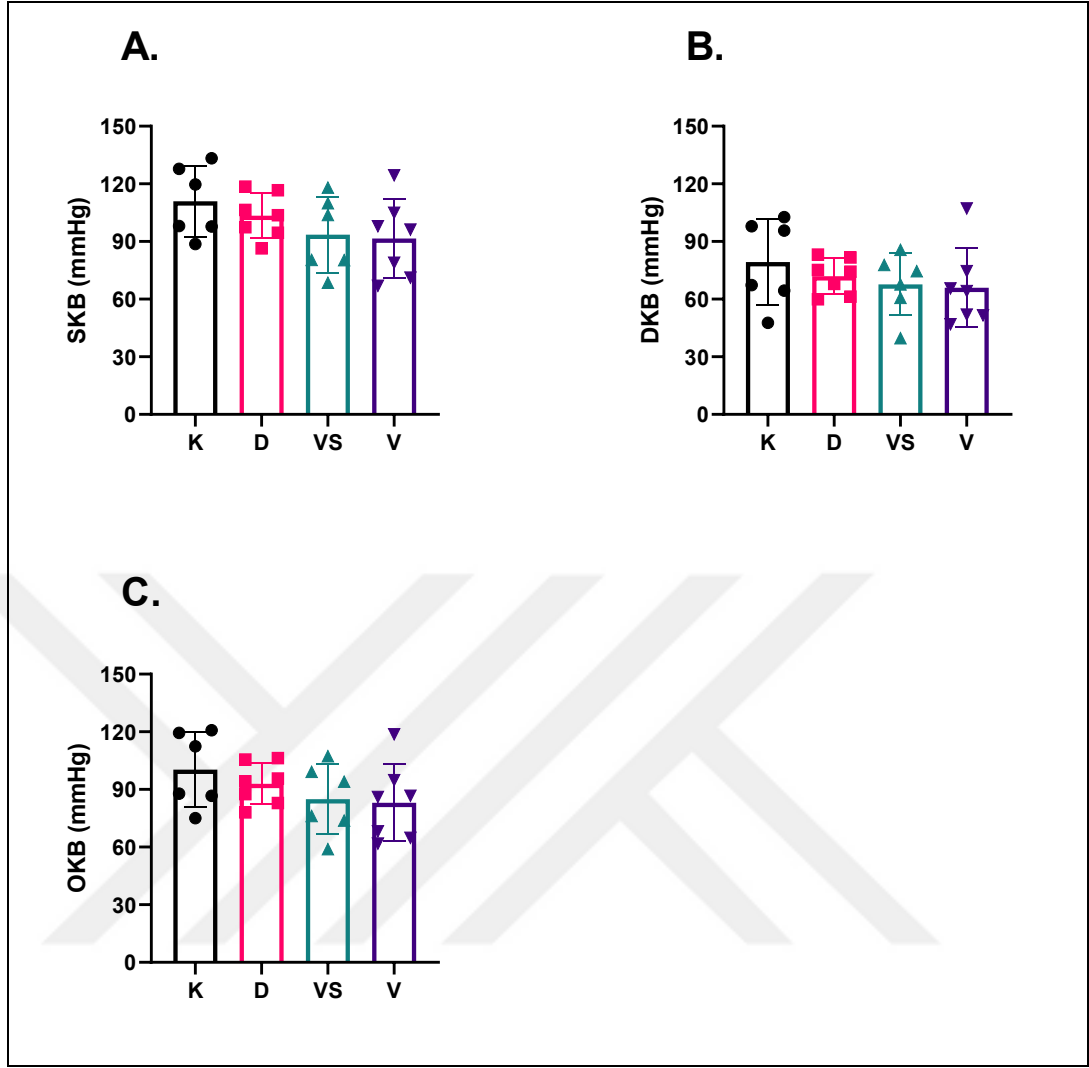
Şekil 3.4. Sıçanların plazma NT-proBNP düzeyleri

K, Kontrol (n=10); D, Diabetik (n=10); VS, Valsartan/sakubitril tedavili diabetik (n=12); V, Valsartan tedavili diabetik (n=10).

3.2. İn vivo Kardiyak Ölçümler

3.2.1. İn vivo Kateterizasyon Sonuçları

Anestezi altındaki sıçanların karotid arterine yerleştirilen basınç-hacim kateteri yardımıyla bazal durumdaki kan basıncı değerleri ölçülmüştür. Sistolik kan basıncı (SKB) (K: $110,89 \pm 18,41$; D: $103,40 \pm 11,69$; VS: $93,54 \pm 19,72$; V: $91,52 \pm 20,41$) (mmHg) (Şekil 3.5A), diyastolik kan basıncı (DKB) (K: $79,29 \pm 22,43$; D: $71,94 \pm 9,23$; VS: $67,69 \pm 16,18$; V: $65,99 \pm 20,57$) (mmHg) (Şekil 3.5B) ve ortalama kan basıncı (OKB) (K: $100,36 \pm 19,55$; D: $92,91 \pm 10,77$; VS: $84,92 \pm 18,24$; V: $83,01 \pm 20,13$) (mmHg) (Şekil 3.5C) değerleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.



Şekil 3.5. Sıçanların karotid arterden ölçülen kan basıncı değerleri

A. SKB, sistolik kan basıncı; **B.** DKB, diyastolik kan basıncı; **C.** OKB, ortalama kan basıncı. K, Kontrol (n=6); D, Diabetik (n=7); VS, Valsartan/sakubitril tedavili diabetik (n=6); V, Valsartan tedavili diabetik (n=7).

Basıncı-hacim kateterinin sol ventriküle yerleştirilmesi ile bazal hemodinamik kalp parametreleri hesaplanmıştır. Oluşturulan diabet modelinde sıçanlarda kilo kaybı gözlenmiştir. Kilo kaybına bağlı olarak hacim parametreleri de değişeceğinden hacim parametrelerinin hem ölçülen değerleri hem de bu değerlerin sıçanların ağırlığına bölünerek hesaplanan indeks değerleri verilmiştir (Çizelge 3.3). Kalp atım hızı diabetik grupta anlamlı olarak azalmış, tedavi uygulamaları sonucunda ise düzelmemiştir. Diyastol sonu hacim indeksi ve sistol sonu hacim indeksi diabetik grupta anlamlı olarak artmış, tedavi uygulamalarıyla ise bu değerlerde herhangi bir

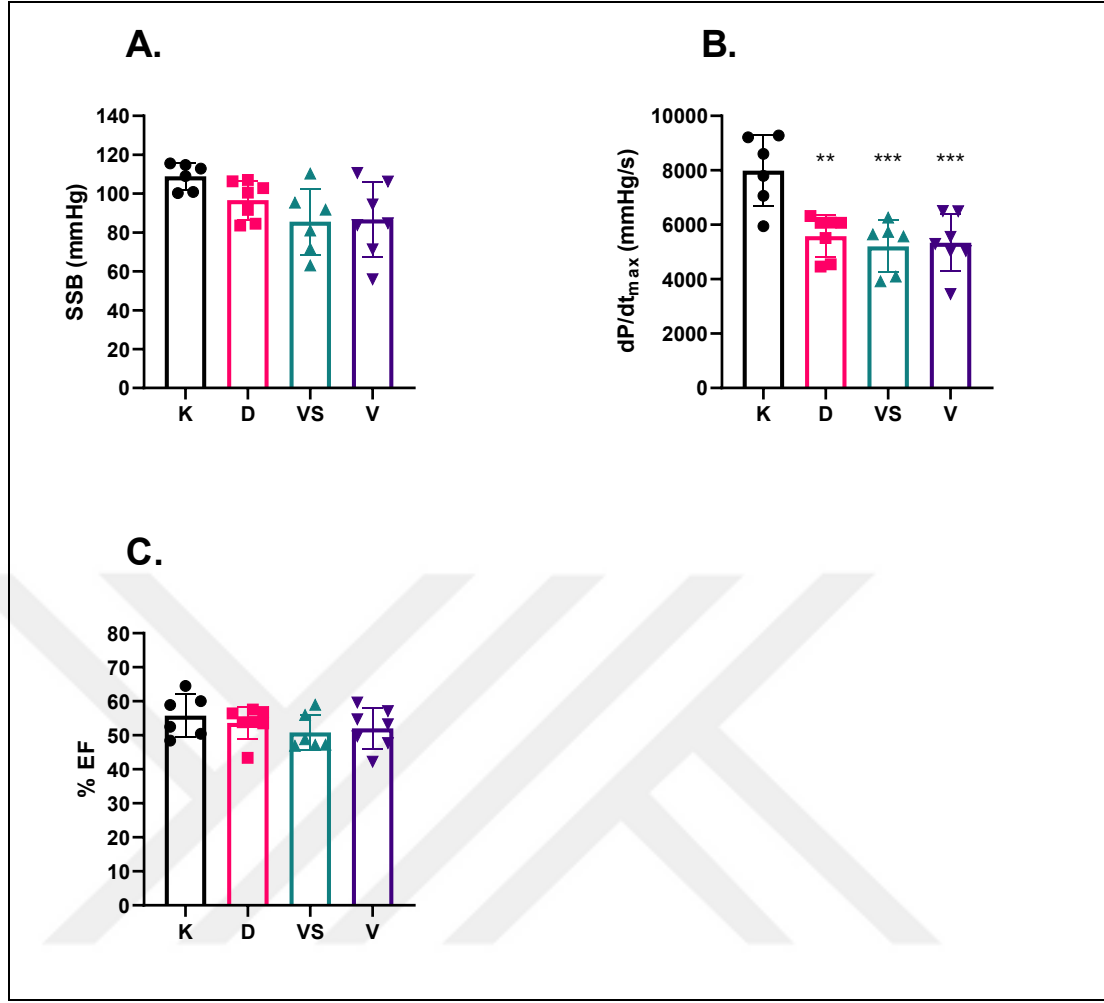
iyileşme gözlenmemiştir. Atım hacmi indeksi ise sadece diabetik sıçanlarda kontrol sıçanlara oranla anlamlı olarak artmıştır.

Çizelge 3.3. *In vivo* bazal kardiyak hemodinamik parametreler

KAH, kalp atım hızı; DSH, diyastol sonu hacmi; DSHI, diyastol sonu hacim indeksi; SSH, sistol sonu hacmi; SSHI, sistol sonu hacim indeksi; AH, atım hacmi; AHI, atım hacmi indeksi; KD, kardiyak debi; KI, kardiyak indeks. K, Kontrol (n=6); D, Diabetik (n=7); VS, Valsartan/sakubitril tedavili diabetik (n=6); V, Valsartan tedavili diabetik (n=7).*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001, kontrole göre anlamlılık

	K (n=6)	D (n=7)	VS (n=6)	V (n=7)
KAH (atım/dk)	311,13 ± 39,03	247,17 ± 20,27**	256,29 ± 18,74**	251,35 ± 21,76**
DSH (µL)	370,64 ± 69,67	436,66 ± 46,89	436,09 ± 76,22	411,52 ± 74,01
DSHI (µL/g)	0,92 ± 0,16	1,56 ± 0,29**	1,59 ± 0,31**	1,43 ± 0,29*
SSH (µL)	162,06 ± 37,83	200,17 ± 26,07	209,34 ± 26,93	191,61 ± 22,42
SSHI (µL/g)	0,40 ± 0,08	0,71 ± 0,13**	0,77 ± 0,18***	0,67 ± 0,11**
AH (µL)	208,58 ± 47,93	236,49 ± 36,31	226,75 ± 60,39	219,91 ± 60,81
AHI (µL/g)	0,52 ± 0,12	0,85 ± 0,19*	0,82 ± 0,18	0,76 ± 0,21
KD (mL/dk)	65,39 ± 19,68	58,35 ± 10,17	58,69 ± 18,80	55,38 ± 17,13
KI (mL/dk.g)	0,16 ± 0,05	0,21 ± 0,04	0,21 ± 0,05	0,19 ± 0,05

Kalbin sistolik fonksiyonunu gösteren sistol sonu basıncı (K: 108,89 ± 6,82; D: 96,63 ± 9,97; VS: 85,53 ± 17,09; V: 86,73 ± 19,22) (mmHg) (Şekil 3.6A) ve % EF değerleri (K: %55,80 ± 6,29; D: %53,63 ± 4,82; VS: %50,83 ± 5,27; V: %52,04 ± 5,94) (Şekil 3.6C) açısından gruplar arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Bununla birlikte sistolik fonksiyonun diğer bir göstergesi olan kasılma hızı değeri (K: 7983,43 ± 1313,79; D: 5579,11 ± 775,70; VS: 5204,35 ± 959,75; V: 5338,74 ± 1038,70) (mmHg/s) (Şekil 3.6B) hem diabetik hem de tedavili gruplarda kontrole oranla anlamlı olarak azalmıştır. Tedavi yaklaşımlarının kalbin kasılma hızı üzerinde iyileştirici etkisi gözlenmemiştir.

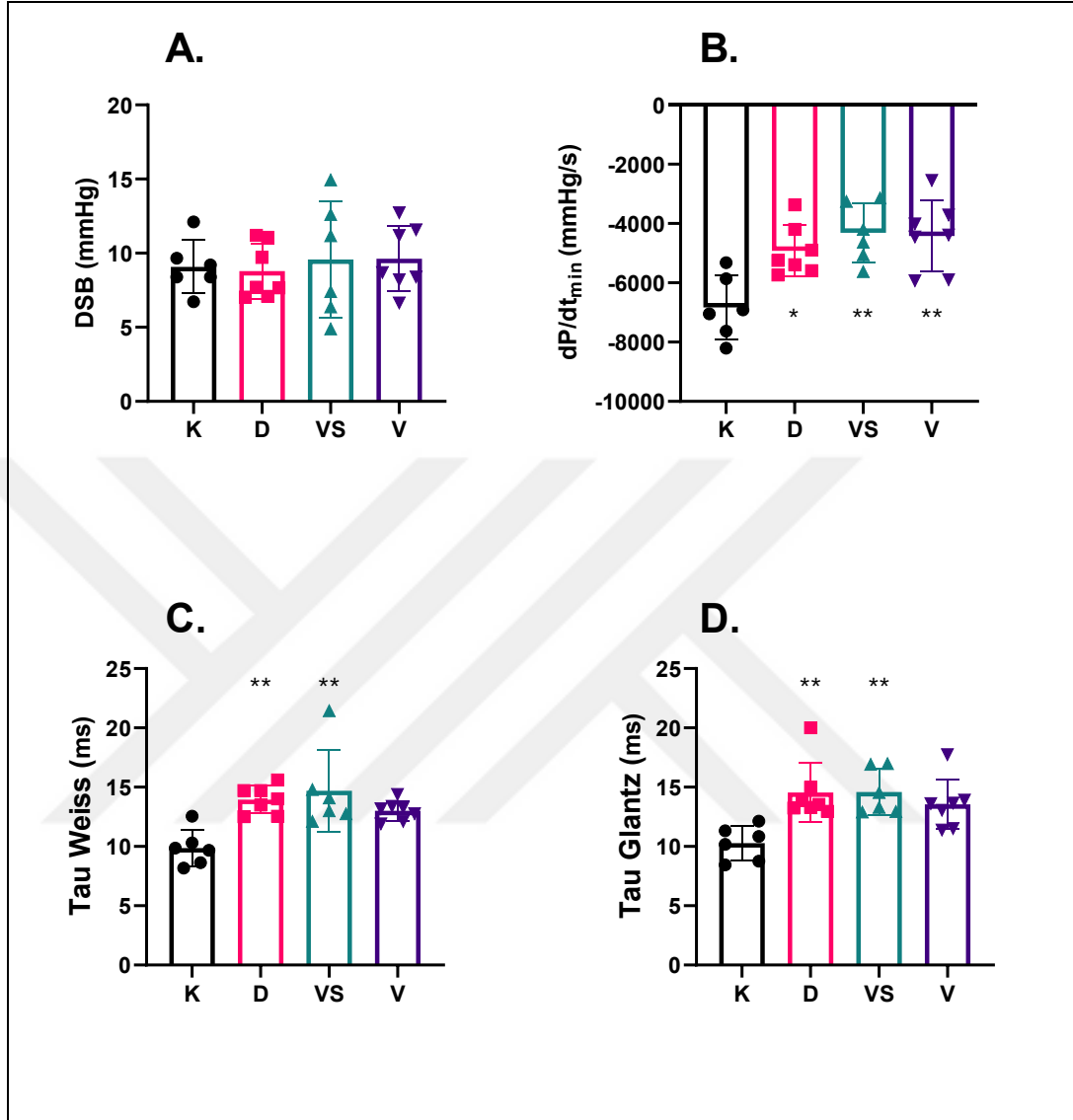


Şekil 3.6. *In vivo* PV-loop sistolik fonksiyon parametreleri

A. SSB, sistol sonu basınç; **B.** dp/dt_{max}, kasılma hızı; **C.** % EF, ejeksiyon fraksiyonu. K, Kontrol (n=6); D, Diabetik (n=7); VS, Valsartan/sakubitril tedavili diabetik (n=6); V, Valsartan tedavili diabetik (n=7). **, p<0,01; ***, p<0,001 kontrole göre anlamlılık.

Kalbin diyastolik fonksiyonunun göstergelerinden olan diyastol sonu basıncı (K: $9,08 \pm 1,79$; D: $8,78 \pm 1,84$; VS: $9,57 \pm 3,94$; V: $9,63 \pm 2,20$) (mmHg) (Şekil 3.7A) gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Diyastolik fonksiyonun diğer göstergelerden gevşeme hızı (K: $-6830,38 \pm 1077,26$; D: $-4917,33 \pm 854,01$; VS: $-4314,72 \pm 987,51$; V: $-4418,36 \pm 1200,54$) (mmHg/s) (Şekil 3.7B) diabetik grupta anlamlı olarak azalırken, her iki tedavi ile de gevşeme hızında düzelme gözlenmemiştir. İzovolumik gevşeme sabiti değerleri (Tau Weiss: K: $9,87 \pm 1,54$; D: $13,94 \pm 1,17$; VS: $14,71 \pm 3,44$; V: $13,00 \pm 0,84$; Tau Glantz: K: $10,28 \pm 1,45$; D: $14,56 \pm 2,49$; VS: $14,60 \pm 1,92$; V: $13,56 \pm 2,12$) (ms) (Şekil 3.7C ve Şekil 3.7D) ise diabetik

sıçanlarda anlamlı olarak yükselmiş ve tedavi yaklaşımlarıyla bu değerler düzelmemiştir.



Şekil 3.7. *İn vivo* PV-loop diyastolik fonksiyon parametreleri

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

İn vivo basınç-hacim ilişkisi ölçümlerinde bazal hemodinamik parametrelerin ölçülmesinin ardından, vena cavaya birkaç defa ard arda 5 sn süreyle bası uygulanarak oklüzyon yapılmıştır. Böylece kalbin ard yük bağımsız parametreleri olan ESPVR, EDPVR ve PRSW ölçülmüştür. Bu değerlere bakıldığında, gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir (Çizelge 3.4).

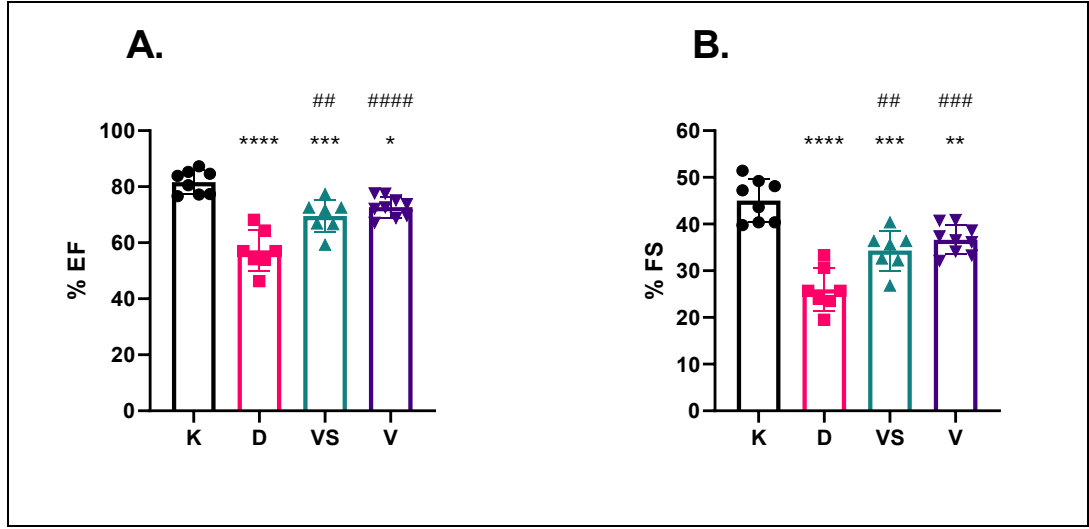
Çizelge 3.4. Ard yük bağımsız *in vivo* kardiyak parametreler

ESPVR, sistol sonu basınç hacim ilişkisi; EDPVR, diyastol sonu basınç hacim ilişkisi; PRSW, ard yük bağımsız atım gücü. K, Kontrol (n=5); D, Diabetik (n=6); VS, Valsartan/sakubitril tedavili diabetik (n=6); V, Valsartan tedavili diabetik (n=6).

	K (n=5)	D (n=6)	VS (n=6)	V (n=6)
ESPVR	0,390 ± 0,156	0,461 ± 0,231	0,345 ± 0,126	0,349 ± 0,156
EDPVR	0,010 ± 0,002	0,007 ± 0,001	0,007 ± 0,003	0,006 ± 0,003
PRSW	62,581 ± 9,440	55,779 ± 8,932	54,754 ± 2,927	54,813 ± 3,780

3.2.2. İn vivo Ekokardiyografi Sonuçları

İn vivo ekokardiyografi ölçümleri sonucunda kalbin sistolik fonksiyon parametrelerinden olan %EF (Şekil 3.8A) ve %FS (Şekil 3.8B) değerlerinin diabetik sıçanlarda kontrol sıçanlara oranla önemli ölçüde azaldığı ve diabette kardiyak fonksiyonun bozulduğu gözlenmiştir. Hem valsartan/sakubitril hem de valsartan tedavisinin %EF ve %FS değerlerini birbirlerine üstünlükleri olmaksızın, anlamlı şekilde iyileştirdikleri gözlemlenmiştir (Çizelge 3.5). Basınç-hacim ilişkisi sonuçlarında olduğu gibi ekokardiyografi deneylerinde de hacim parametreleri hem ölçülen hem de beden ağırlığına bölünerek hesaplanan indeks değerleri olarak verilmiştir. Bununla birlikte, duvar kalınlığı ve iç çap değerleri de önceki çalışmalarda gösterildiği üzere hem ölçülen hem de beden ağırlığına oranla hesaplanan indeks değeri olarak verilmiştir (Matyas ve ark., 2018) (Çizelge 3.5).



Şekil 3.8. *İn vivo* ekokardiyografi sistolik fonksiyon parametreleri

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

Kalp atım hızı kontrole kıyasla hem diabetik hem de tedavili diabetik gruplarda anlamlı olarak azalmıştır. Diyastolde intraventriküler septum kalınlığı indeksi diabetik grupta anlamlı olarak artmış, tedavi yaklaşımlarıyla bu değer kontrol seviyesine dönmemiştir. Sistol sırasında sol ventrikül iç çapında diabetik grupta kontrole kıyasla belirgin bir artış gözlenmiştir. Valsartan/sakubitril tedavili grupta kardiyak debide gözlenen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bununla birlikte sistol sırasında sol ventrikül iç çapının indeks değeri ise diabetik ve tedavili gruplarda kontrol grubuna oranla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Kardiyak debi ise kontrol gruba kıyasla diabetik ve valsartan tedavili diabetik gruplarda anlamlı olarak azalmıştır. Ekokardiyografi deneylerinde ölçülen diğer *in vivo* kardiyak parametrelerde ise hayvan grupları arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. *In vivo* ekokardiyografi parametreleri

IVSd, diyastolde interventriküler septumun kalınlığı; IVSId, diyastolde interventriküler septumun kalınlığı indeksi; LVIDd, diyastolde sol ventrikül iç çapı; LVIDId, diyastolde sol ventrikül iç çapı indeksi; LVPWd, diyastolde sol ventrikülün arka duvar kalınlığı; LVPWId, diyastolde sol ventrikülün arka duvar kalınlığı indeksi; IVSs, sistolde interventriküler septumun kalınlığı; IVSIs, sistolde interventriküler septumun kalınlığı indeksi; LVIDs, sistolde sol ventrikül iç çapı; LVIDIs, sistolde sol ventrikül iç çapı indeksi; LVPWs, sistolde sol ventrikülün arka duvar kalınlığı; LVPWIs, sistolde sol ventrikülün arka duvar kalınlığı indeksi; KAH, kalp atım hızı; DSH, diyastol sonu hacmi; SSH, sistol sonu hacmi; AH, atım hacmi; KD, kardiyak debi; % EF, ejeksiyon fraksiyonu; % FS, fraksiyonel kısalma. K, Kontrol (n=8); D, Diabetik (n=7); VS, Valsartan/sakubitril tedavili diabetik (n=7); V, Valsartan tedavili diabetik (n=9). *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; ****, p<0,0001 kontrole göre anlamlılık. ##, p<0,01; ###, p<0,001; ####, p<0,001 diabete göre anlamlılık.

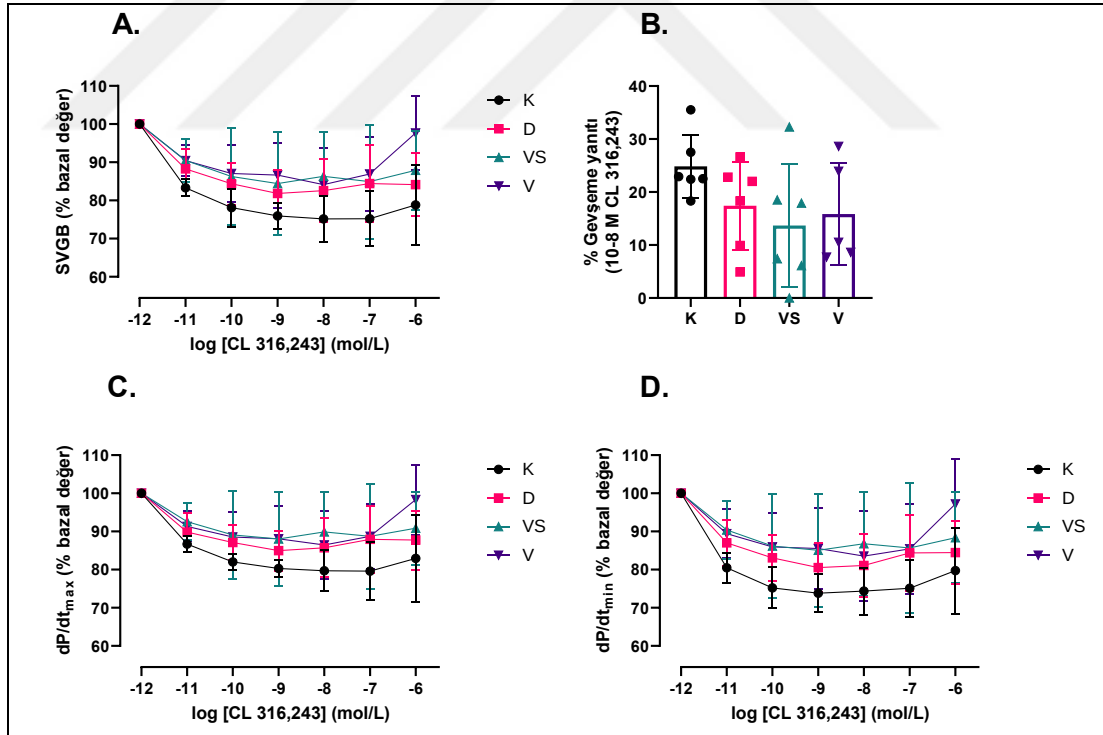
	K (n=8)	D (n=7)	VS (n=7)	V (n=9)
IVSd (mm)	1,91 ± 0,58	2,31 ± 0,38	1,83 ± 0,25	1,78 ± 0,25
IVSId (mm/kg)	4,30 ± 1,37	6,94 ± 1,04***	5,64 ± 0,65	5,73 ± 1,13
LVIDd (mm)	5,49 ± 0,67	5,06 ± 0,91	5,21 ± 1,12	4,92 ± 0,50
LVIDId (mm/kg)	12,26 ± 1,55	15,33 ± 3,35	16,46 ± 5,39	15,84 ± 2,52
LVPWd (mm)	2,35 ± 1,90	2,20 ± 0,72	1,89 ± 0,29	2,01 ± 0,66
LVPWId (mm/kg)	5,05 ± 3,47	6,51 ± 1,65	5,82 ± 0,87	6,47 ± 2,30
IVSs (mm)	2,93 ± 0,83	2,76 ± 0,51	2,17 ± 0,45	2,17 ± 0,35
IVSIs (mm/kg)	6,50 ± 1,69	8,31 ± 1,65	6,76 ± 1,65	6,96 ± 1,37
LVIDs (mm)	3,01 ± 0,21	3,71 ± 0,51*	3,43 ± 0,78	3,10 ± 0,21
LVIDIs (mm/kg)	6,75 ± 0,72	11,27 ± 2,20**	10,86 ± 3,80**	9,96 ± 1,16*
LVPWs (mm)	2,93 ± 0,49	2,80 ± 0,66	2,56 ± 0,54	2,79 ± 0,60
LVPWIs (mm/kg)	6,57 ± 1,36	8,33 ± 1,42	7,80 ± 1,09	9,00 ± 2,29*
KAH (atım/dk)	309,50 ± 21,32	264,00 ± 14,22**	231,43 ± 24,10****	241,67 ± 28,20****
DSH (μL)	387,50 ± 145,77	328,57 ± 149,60	357,14 ± 250,71	300,00 ± 86,60
DSHI (μL/g)	0,86 ± 0,32	1,00 ± 0,47	1,17 ± 0,94	0,97 ± 0,33
SSH (μL)	100,00 ± 0,00	142,86 ± 53,45	142,86 ± 78,68	100,00 ± 0,00
SSHI (μL/g)	0,22 ± 0,02	0,44 ± 0,18	0,46 ± 0,30	0,32 ± 0,03
AH (μL)	350,00 ± 130,93	214,29 ± 106,90	257,14 ± 139,73	211,11 ± 92,80
AHI (μL/g)	0,78 ± 0,29	0,65 ± 0,31	0,83 ± 0,55	0,69 ± 0,34
KD (mL/dk)	101.25 ± 39.07	52.86 ± 29.84*	60.14 ± 28.64	51.11 ± 13.64**
KI (mL/dk.g)	0,23 ± 0,09	0,16 ± 0,09	0,19 ± 0,11	0,17 ± 0,05
%EF	81,60 ± 4,20	57,27 ± 7,21****	69,56 ± 5,84***##	72,69 ± 3,72*#####
%FS	45,01 ± 4,54	26,04 ± 4,60****	34,34 ± 4,31***##	36,63 ± 3,11*#####

3.3. İn vitro Kalp Deneyleri

3.3.1. Langendorff Kalp Preparasyonu Deneyi

3.3.1.1. CL 316,243 Yanıtları

β_3 -AR agonisti CL316,243 ile elde edilen sol ventrikül içi basınçta gözlenen % değişim (Şekil 3.9A) gruplar farklılık göstermemektedir. Buna ek olarak, kasılma/gevşeme hızı (% bazal değer) (Şekil 3.9C ve Şekil 3.9D) ve 10^{-8} M CL 316,243 varlığındaki gevşeme yanıtları (K: $24,82 \pm 5,98$; D: $17,42 \pm 8,34$; VS: $15,21 \pm 12,27$; V: $15,86 \pm 9,66$) (Şekil 3.9B) da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

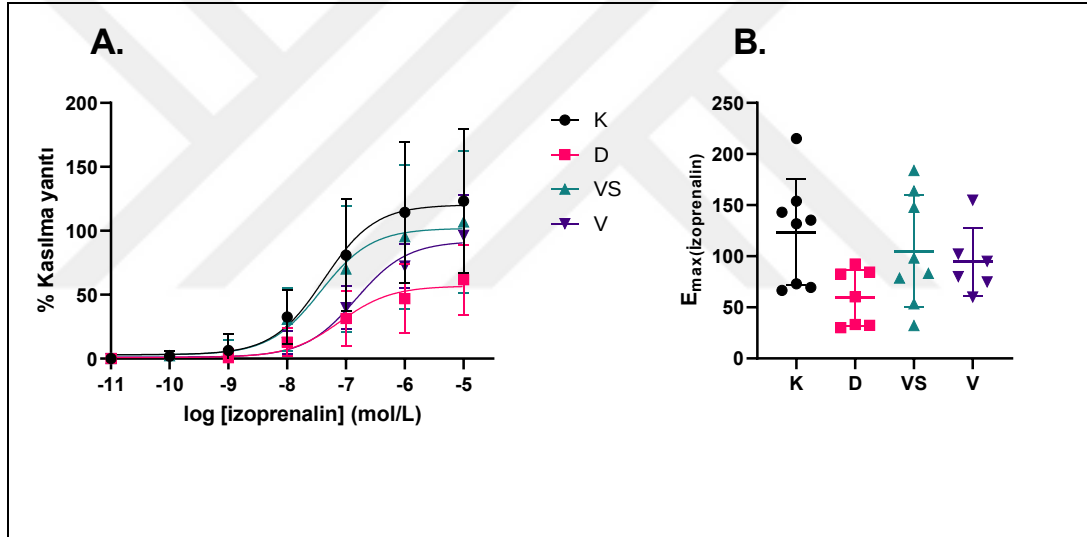


Şekil 3.9. Langendorff kalp preparasyonunda CL316,243 ile elde edilen gevşeme yanıtları **A.** SVGB, sol ventrikül içi gelişen basınç; **B.** 10^{-8} M CL 316,243 ile elde edilen % gevşeme yanıtı; **C.** dP/dt_{max} (%bazal değer), kasılma hızı; **D.** dP/dt_{min} (%bazal değer), gevşeme hızı. K, Kontrol (n=6); D, Diabetik (n=6); VS, Valsartan/sakubitril tedavili diabetik (n=6); V, Valsartan tedavili diabetik (n=5).

3.3.2. İzole Papiller Kas Deneyi

3.3.2.1. İzoprenalin Yanıtları

Nonselektif β –AR agonisti izoprenalinin artan dozlarda kümülatif olarak uygulanması ile elde kasılma yanıtları (Şekil 3.10A) diabetik grupta beklenildiği şekilde azalmıştır. Kasılma yanıtlarında hem valsartan/sakubitril hem de valsartan tedavisiyle gözle görülür bir iyileşme vardır (İzoprenalin E_{max} : K: %123,49 $\pm$ 51,52; D: %59,37 $\pm$ 27,45; VS: %105,15 $\pm$ 54,35; V: %94,52 $\pm$ 33,07) (Şekil 3.10B). Ne var ki, standart sapmanın yüksek olması nedeniyle gruplar arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

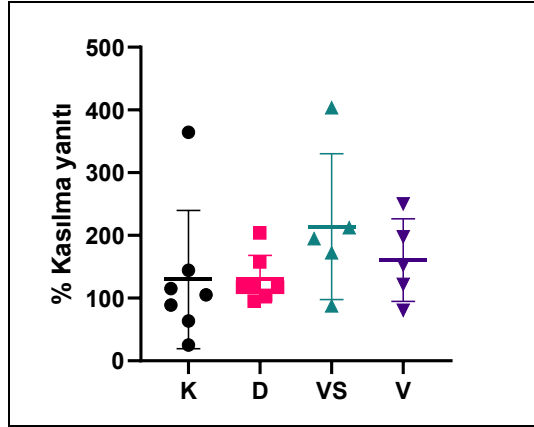


Şekil 3.10. Papiller kasta izoprenalinle elde edilen kasılma yanıtları

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

3.3.2.2. Forskolin Yanıtları

Adenilil siklaz aktivatörü forskolin uygulaması ile elde edilen kasılma yanıtlarında (K: %129,62 $\pm$ 110,25; D: %130,47 $\pm$ 37,74; VS: %214,10 $\pm$ 116,25; V: %160,62 $\pm$ 65,86) gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir (Şekil 3.11).



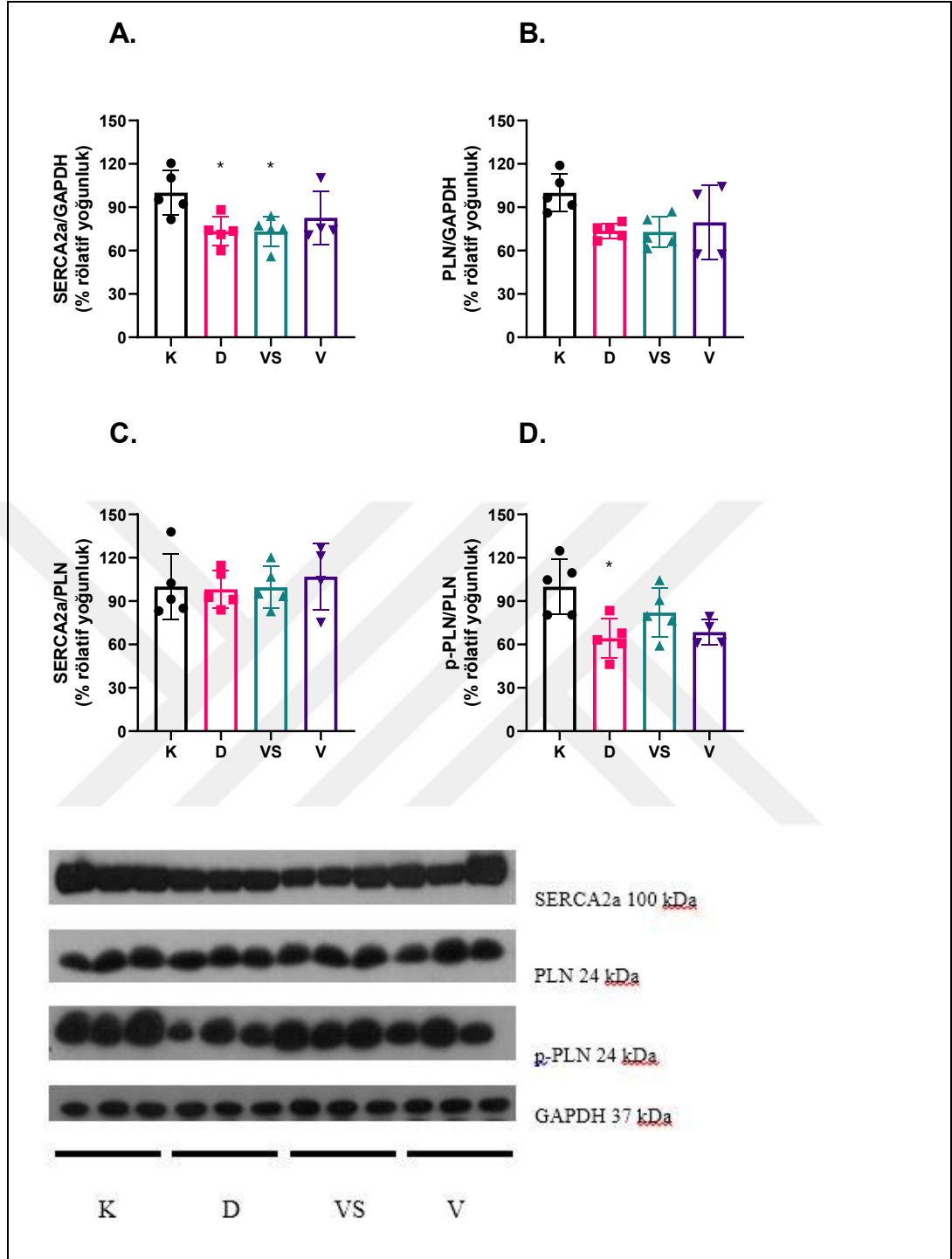
Şekil 3.11. Papiller kasta forskolin ile elde edilen kasılma yanıtları
K, Kontrol (n=7); D, Diabetik (n=7); VS, Valsartan/sakubitril tedavili diabetik (n=5); V; Valsartan tedavili diabetik (n=5).

3.4. Western Blot Deneyleri

3.4.1. SERCA2a, Fosfolamban ve Fosforile Fosfolamban İfadenme Düzeyi

Kalpde diyastolik fonksiyonun önemli bir bileşeni olan SERCA2a ifadenmesinde diabetik ve valsartan/sakubitril tedavili grupta anlamlı olarak azalırken, valsartan tedavili grupta SERCA2a ifadenmesi düzeyi kontrole oranla daha az olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmemiştir (K: %100,00 ± 15,38; D: %73,38 ± 10,05; VS: %73,24 ± 10,44; V: %82,75 ± 18,49) (Şekil 3.12A).

SERCA2a üzerinde inhibitör etkinlik gösteren PLN ifadenme düzeyinde gruplar arasında bir farklılık bulunmamıştır (K: %100,00 ± 13,08; D: %73,68 ± 5,23; VS: %72,96 ± 10,74; V: %79,56 ± 25,52) (Şekil 3.12B). Öte yandan p-PLN/PLN oranı diabetik grupta kontrole oranla anlamlı olarak azalırken, valsartan/sakubitril tedavili grupta bu oran artsa da kontrol seviyesine ulaşmamıştır (K: %100,00 ± 19,33; D: %64,28 ± 13,40; VS: %82,02 ± 16,83; V: %68,59 ± 8,84) (Şekil 3.12D). SERCA2a/PLN oranı ise gruplar arasında benzerlik göstermektedir (K: %100,00 ± 22,51; D: %98,21 ± 12,94; VS: %99,62 ± 14,31; V: %106,94 ± 23,26) (Şekil 3.12C).



Şekil 3.12. Kalpte gevşeme yolağı ile ilişkili protein ifadenmeleri

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

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda esas olarak bir ARB olan valsartan ile NEP inhibitörü olan sakubitril bileşiklerinin kombinasyonundan oluşan LCZ696 isimli ilacın yüksek yağlı diyet ve düşük doz STZ ile indüklenen diabetik sıçanlarda kardiyak fonksiyonu ne şekilde etkilediği araştırılmıştır. Elde ettiğimiz bulgular bu ilacın çalıştığımız diabet modelinde kardiyak fonksiyona belirgin bir etkisinin olmadığını ortaya koymaktadır. Çalışmamızda gözlediğimiz LCZ696'nın tek olumlu etkisi diabette azalan ejeksiyon fraksiyonunu ve fraksiyonel kısalmayı düzeltmesidir. Ne var ki, burada da valsartan/sakubitril kombinasyonunun tek başına valsartan tedavisine herhangi bir üstünlüğü bulunamamıştır.

2015 yılında “Entresto” adı ile düşük HFrEF tedavisi için ruhsat alan LCZ696 bir ARB olan valsartan ile NEP inhibitörü sakubitrilin kombinasyonudur. Sakubitril natriüretik peptidleri yıkan neprilisin enzimini inhibe ettiği için, bu kombinasyon sayesinde natriüretik peptidlerin düzeyinin artacağı ve ARB'lerle gözlenen olumlu etkinin potansiyalize olacağı düşünülmüştür. Kalp yetmezliğinde LCZ696 ile valsartanın etkilerinin karşılaştırıldığı ve hali hazırda yürütülmekte olan birçok klinik çalışmanın sonuçları henüz rapor edilmemiştir. Şimdiye kadar sonucu açıklanan tek çalışmada ise ilacın endikasyon aldığı HFrEF hastalarda değil HFpEF hastalarda LCZ696'nın etkinliği valsartanla karşılaştırılmıştır. Bu hastalarda LCZ696, kalp yetmezliğine bağlı hastaneye yatış ve kardiyovasküler nedenlere bağlı ölüm oranını azaltması açısından valsartandan daha üstün bulunmamıştır (Solomon ve ark., 2019) Buna ek olarak, 27 ay süren PARADIGM-HF isimli klinik çalışmada ilaç bir ACEi olan enalapril ile karşılaştırılmıştır. Kronik kalp yetmezlikli ve sistolik disfonksiyonlu hastalarda LCZ696'nın enalapril ile oranla kardiyovasküler ölüm riskini %20, hastaneye yatma oranını ise %21 oranında azalttığı bulunmuştur. Kalp yetmezliğine bağlı semptomlar ve fiziksel kısıtlamalar da anlamlı olarak azalmıştır (McMurray ve ark., 2014).

LCZ696'nın olumlu etkileri kardiyak disfonksiyon görülen çeşitli deneysel modellerde de gösterilmiştir (Miyoshi ve ark., 2019; Trivedi ve ark., 2018 ve Ushijima ve ark., 2017). Böylece prelinik ve klinik çalışmaların ortaya koyduğu ilaca bağlı kardiyak yararının diabetik kalpte de gözlenebileceği düşüncesiyle, çalışmamızda yüksek yağlı diyet ve düşük doz STZ ile oluşturulan diabet modelinde LCZ696'nın kardiyak fonksiyona etkisi valsartan ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda LCZ696'nın kardiyak fonksiyon üzerine etkisini incelemek için yüksek yağ diyeti ve düşük doz STZ ile oluşturulan diabet modeli seçilmiştir. Bu modelin seçilmesinin nedeni tip 2 diabete daha yakın olması ve elde edilecek sonuçların klinik bulgulara daha kolay ekstrapolare edilebileceği düşüncesidir. Diabetik hayvanlarda beklenildiği kadar kilo alımı olmaması modelin validasyonunun yeterli olmadığını düşündürse de, yükselen açlık insulini, yüksek HOMA-IR ve trigliserid düzeyleri istenilen diabetik modelin oluşturulduğuna işaret etmektedir. Burada üstünde durulması gereken bir nokta ise, hem valsartan hem de LCZ696 tedavili diabetik sıçanlardaki kan şekeri değerlerinin tedavisiz diabetiklere göre anlamlı olarak daha yüksek olmasıdır. İlginç olarak, bu yükselmenin her iki tedavi grubunda da gözlenmesi valsartan kaynaklı olabileceğini akla getirmektedir. Ne var ki, gözlenenin aksine ARB'lerin kan şekerini düşürücü etkisi bildirilmiştir (Kitamura ve ark., 2007). Ayrıca, böbrek koruyucu etkisi nedeniyle de diabetik hastalarda ARB kullanımı oldukça yaygındır. Bu nedenle, tedavili gruplarda gözlenen yüksek kan şekerini valsartan ile ilişkilendirmek mantıklı görünmemektedir. Buna ek olarak, LCZ696'nın etken maddeleri olan valsartan/sakubitril kombinasyonunun obez bireylerde insülin duyarlılığını artırdığı rapor edilmiştir (Jordan ve ark., 2017). Aslında bu durum tedavili diabetik sıçanların kan şekerlerinin tedavi öncesi de diabetik gruba göre anlamlı olarak yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Çalışmamızda randomizasyon henüz diabet indüksiyonundan önce yapılmış ve tesadüfi olarak tedavi alacak gruplardaki sıçanların kan şekerleri daha yüksek seyretmiştir. Çalışma dizaynında belirlenen şekilde uyguladığımız randomizasyonu bozmamak adına, tedaviye başlamadan önce gruplar arası benzer kan şekeri düzeyleri olmasına yönelik bir müdahalede bulunulmaksızın tedaviye başlanmıştır. Metabolik parametrelerden kolesterol düzeylerinin LCZ696 tedavili sıçanlarda yüksek bulunması ise direkt olarak ilacın olumsuz bir özelliği

olarak düşünülebilir. Ne var ki, bu durum ilacın glukoz ve lipid metabolizması üzerinde olumlu etkilerini gösteren Jordan ve arkadaşlarının (2017) bulguları ile örtüşmemektedir. Gözlediğimiz bu sonucun bu gruptaki sıçanların daha ağır bir diabet tablosu sergilemesi ile mi yoksa ilaca bağlı bir yan etki ile mi ilişkili olduğunu ileriki çalışmalar gösterecektir.

Çalışmamızda diabetik grupta kalp ağırlığının beden ağırlığına oranının artmış bulunması kardiyak hipertrofi bulgusu olarak yorumlanmıştır. Bu aslında beklenen bir durumdur, nitekim diabetik kalpte hipertrofi bulgusu yaygındır (Negishi, 2018 ve Rubler ve ark., 1972). Öte yandan, ne LCZ696 ne de valsartan tedavisi kardiyak hipertrofiyi düzeltmemiştir. Bu veriye paralel olarak, ekokardiyografi deneylerinde kardiyak hipertrofinin göstergelerinden olan ve diabette artan diyastolde interventriküler septumun kalınlığı indeksi ve sistol sırasında sol ventrikül iç çapının indeks değerleri üzerine tedavi yaklaşımlarının olumlu etkileri gözlenmemiştir. Literatüre baktığımızda, LCZ696'nın hem in vivo olarak miyokard infarktüs modeli sıçanlarda hem de in vitro olarak miyositlerde kardiyak hipertrofiyi düzelttiği bildirilmiştir (von Lueder ve ark., 2015). Bununla birlikte ilacın kardiyak hipertrofiyi iyileştirdiğini gösteren diğer çalışmaların (Ge ve ark., 2020; Kusaka ve ark., 2015 ve Suematsu ve ark., 2018) yanı sıra LCZ696'nın sadece fibrozisi iyileştirip, hipertrofi üzerinde olumlu etkisinin olmadığı da gösterilmiştir (Miyoshi ve ark., 2019). Bulgular arasındaki farklılığı açıklamak ancak daha fazla çalışma ile mümkün olabilecektir.

Çalışmamızda ilk olarak LCZ696'nın kalbin in vivo sistolik ve diyastolik fonksiyonuna etkisi incelenmiştir, nitekim sistolik ve/veya diyastolik disfonksiyon diabetik kalbin önemli bulgularından biridir (Liu ve ark., 2013; Matyas ve ark., 2018; Semeniuk ve ark., 2002; Werner ve ark., 2018; Wold ve ark., 2001 ve Wu ve ark., 2018). Sistolik ve diyastolik fonksiyon hem ekokardiyografi hem de PV loop analizi ile incelenmiştir. Ekokardiyografi parametrelerinden yalnızca %EF ve %FS diabetik kalpte belirgin olarak azalmıştır ki bu da diabete bağlı sistolik disfonksiyon bulgusu ile uyumludur. Öte yandan, LCZ696 tedavisi ile her iki parametre de düzelmiştir ki bu da literatürdeki sonuçlarla örtüşmektedir. Nitekim, LCZ696 ile yapılan az sayıda prelinik çalışmalardan birinde ilacın HFrEF modeli oluşturulan diabetik farelerde sol

ventrikül ejeksiyon fraksiyonunun iyileştiği bildirilmiştir (Suematsu ve ark., 2016). Bu çalışmada ilacın bu etkisi valsartan tedavili gruba göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur. Ne var ki, bizim çalışmamızda LCZ696'nın %EF ve %FS üzerindeki yararı valsartandan üstün bulunmamıştır.

Sistolik fonksiyon hakkında fikir veren bir diğer parametre olan in vivo kasılma hızı ise PV loop analizi ile değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular bu parametrenin diabette azaldığını ortaya koymaktadır. Ne var ki, ne LCZ696 ne de valsartan tedavisi kasılma hızını artırmamıştır. Diyastolik fonksiyonun yorumlanmasında kullanılan ölçütlerden olan diyastol ve sistol sonu hacim indeksleri diabetik kalpte belirgin olarak artmıştır ki, bu da diabetik kardiyomiyopati bulguları ile paraleldir (Shang ve ark., 2016). Benzer şekilde kalbin gevşeme hızı da diabete bağlı olarak azalmış, buna karşın tedavi ile iyileşmemiştir. Öte yandan, tedavilerin bu parametre üzerinde de olumlu bir etkisi gözlenmemiştir. Diyastolik fonksiyona ilişkin bir başka ölçüt olan Tau değerleri de diabetik kalpte anlamlı olarak artmış ve yalnızca valsartan tedavisi ile belli oranda düzelmiştir. Bu durum, von Lueder ve arkadaşlarının (2015) sonuçları ile örtüşmemektedir, nitekim bu araştırmacılar MI oluşturulan sıçanlarda LCZ696 tedavisi sonrası Tau değerlerinin azaldığını göstermiştir. Bu çalışmada, ayrıca, kalp debisi, diyastol sonucu basınç ya da sistolik kan basıncı gibi birçok hemodinamik parametrenin de tedaviye bağlı olarak iyileştiği ifade edilmiştir. von Lueder ve arkadaşlarınınkinden ve bizim çalışmamızda kullanılan ilaç dozu ve tedavi süresi aynı olmakla birlikte, çalışılan deneysel model farklılığı bulgular arası çelişkiyi belli ölçüde açıklayabilir.

Kalbin sistolik ve diyastolik fonksiyonunun sağlıklı bir şekilde sürdürülmesinde Ca^{++} homeostazının rolü büyüktür (Bers, 2002). Kalbin sistolde kasılması öncelikle L tipi Ca^{++} kanallarından hücre içine Ca^{++} girişi, sonrasında da RyR2 ile SR'den sitozole Ca^{++} çıkışı ile gerçekleşmektedir. Öte yandan, diyastolde sitozoldeki Ca^{++} 'un SERCA2a ile SR'ye geri alınması kritik öneme sahiptir ki, bu da SERCA2 ve üzerinde baskılayıcı rolü olan PLN proteinlerinin dansite ve aktiviteleri ile yakından ilişkilidir. Diyastolde kalbin gevşemesi Ca^{++} 'un SERCA2a ile SR'ye alınmasına bağlı olduğu için (Dhalla ve ark., 1998), SERCA2a ifadelenmesindeki değişimlerin gevşeme hızı

ve Tau gibi parametrelerle yakından ilişki olduğu düşünülmektedir. Gerçekten de, altı haftalık STZ diabetik sıçanlarda SERCA2a ifadenmesinin azaldığı bildirilmiş ve bu durum bozulan diyastolik fonksiyon ile ilişkilendirilmiştir (Connely ve ark., 2007). Benzer şekilde, sekiz ve 12 haftalık diabetik sıçanlarda da SERCA2a düzeyleri azalmıştır (Arioglu-Inan ve ark., 2013; Teshima ve ark., 2000 ve Zhang ve ark., 2008). Çalışmamızda da bu sonuçlara paralel olarak SERCA2a ifadenmesinin diabetik kalpte azaldığı bulunmuştur. Connely ve arkadaşlarının (2007) yorumlarından yola çıkarak, gözlemlediğimiz azalan SERCA2a ifadenmesini bozulan gevşeme hızı ve Tau değerleri ile ilişkilendirmek akla yatkın görünmektedir.

SERCA2a aktivitesi PLN ile düzenlendiği için bu proteinin ifadenmesi ya da aktivitesi de kardiyak fonksiyonu etkilemektedir. Birçok çalışmada PLN ifadenmesinin diabetik sıçan kalbinde arttığı bulunmuştur (Netticadan ve ark., 2001 ve Watanuki ve ark., 2004). Ne var ki, çalışmamızda PLN ifadenmesi bakımından gruplar arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Bu durum çelişkili görünmekle birlikte, benzer sonuçlar farklı araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir. Connely ve arkadaşlarının (2007) altı haftalık diabetik sıçan kalbinde PLN ifadenmesinin değişmediğini göstermiştir. Benzer şekilde, 12 haftalık diabetik sıçanlarda yapılan bir çalışmada da PLN mRNA ifadesi kontrolden farklı bulunmamıştır (Teshima ve ark., 2000). Yine grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada, sekiz haftalık diabetik sıçanlarda PLN düzeyleri gruplar arası benzer bulunmuştur (Arioglu-Inan ve ark., 2013). Öte yandan, p-PLN düzeyinin PLN düzeyine oranlanması PLN'nin aktivitesi hakkında fikir vermektedir. Bu oranın düşük çıkması gevşeme sırasında azalması beklenen PLN'nin SERCA2a üzerindeki frenleyici etkinliğinin istenilen ölçüde gerçekleşmediği şeklinde yorumlanmaktadır. Nitekim, diyastolik disfonksiyon gözlenen patolojilerde bu oranın azaldığına dikkat çekilmektedir. Çalışmamızda diabetik kalpte gözlenen diyastolik fonksiyon bozukluğu patolojiye bağlı olarak azalan p-PLN/PLN oranı ile ilişkilendirilebilir. Söz konusu oran, LCZ696 ve valsartan tedavili gruplarda da diabetik gruba benzer şekilde düşük bulunmuştur.

Çalışmamızda azalan SERCA2a düzeylerinin ya da p-PLN/PLN oranının LCZ696 tedavisi sonrası artmamasını, bu grupta düzelmeyen gevşeme hızı ve Tau

değerleri ile ilişkilendirmek mümkündür. Aynı durum valsartan tedavili grupta ise kısmen geçerlidir. Şöyle ki, bu grupta da azalan SERCA2a ifadesi ile p-PLN/PLN oranı ve kalbin gevşeme hızı düzelmemiştir. Ne var ki, valsartan tedavisi Tau değerlerini belli oranda iyileştirmiştir. Bu durum, Tau gibi diyastolik fonksiyon hakkında fikir veren parametreleri etkileyen tek bileşenin SERCA2a olmaması ile açıklanabilir.

In vivo deneylerin ardından çalışmamızın asıl amacı olan LCZ696'nın diabetik kalpte beta adrenerjik yanıtverirliği nasıl etkilediğini incelemek amacıyla izole Langendorff ve papiller kas sistemlerinde çalışılmıştır. LCZ696'nın β_1 - ve β_2 -AR aracılı kontraktıl yanıtı etkisi literatürde ilk defa çalışmamızda araştırılmıştır. İzoprenalin ile uyarılan β_1 - ve β_2 -AR aracılı kasılma yanıtı diabetik grupta belirgin olarak azalmış ve tedavi sonrasında belli ölçüde artmış olmasına karşın, bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durumun veriler arasındaki yüksek standart sapmadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Öte yandan, diabetik kalpte β_1 - ve β_2 -AR aracılı kasılma yanıtının azaldığı bilinmektedir (Arioglu-Inan ve ark., 2013; Dinçer ve ark., 1998). Bu duruma β_1 -AR lerinin ifadesinin azalması (Arioglu-Inan ve ark., 2013; Dinçer ve ark., 2001 ve Matsuda ve ark., 1999) ve β_2 -AR'lerin desensitizasyonunun (Rockman ve ark., 1998) katkısı olduğu ifade edilmektedir. Çalışmamızda β_1 - ve β_2 -AR'lerin ifadelenmesinin diabete bağlı olarak nasıl değiştiği ya da tedavinin bu düzeyleri ne şekilde etkilediği belirlenemediği için bu bileşenlerin fonksiyonel yanıtı katkısı yorumlanamamıştır. Kalpte β_1 - ve β_2 -AR aracılı kasılma yanıtı AC-cAMP-PKA yolağı üzerinden gerçekleşmektedir (George ve Pitt, 2006). Sinyal yolağındaki önemli bileşenlerden biri olan cAMP'nin değişimi forskolin aracılı yanıtlar üzerinden değerlendirilmiş, ne yazık ki gruplar arası herhangi bir farklılık bulunamamıştır.

Literatürde ilk defa çalışmamızda CL316,243 ile uyarılan β_3 -AR aracılı gevşemeler de incelenmiştir. Langendorff perfüze kalplerde CL316,243 doz bağımlı gevşemeye yol açmıştır. Bu gevşeme yanıtı diabetik kalpte istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte azalma eğilimi göstermektedir. Bu bulgu önceki çalışmalarımızın sonuçları ile çelişkili görünmektedir, nitekim STZ diabetik kalp modelinde yaptığımız

Çalışmalarda β_3 -AR aracılı yanıtın diabete bağlı olarak arttığı bulunmuştur (Arioglu-Inan ve ark., 2017; Kayki-Mutlu ve ark., 2014 ve Uyar-Boztas ve ark., 2017). Bu farklılık diabetik modeller arasındaki farklılığa bağlanabilir. Yanıtın arttığını gözlemlediğimiz diabet modeli yüksek doz STZ ile oluşturulan ve klinikteki tip 1 diabeti yansıtan bir modeldir. Buna karşın, hali hazırda yaptığımız çalışmadaki diabet modeli yüksek yağlı diyet ve düşük doz STZ ile indüklenmektedir ki, bu bakımdan klinikteki tip 2 diabete daha yakındır. LCZ696 ya da valsartan tedavisinin β_3 -AR aracılı gevşeme yanıtı üzerinde herhangi bir etkisi saptanmamıştır.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz bulgular bir ARB ve NEPi kombinasyonu olan LCZ696'nın yüksek yağlı diyet ve düşük doz STZ ile indüklenen diabet modelinde kardiyak fonksiyon üzerine önemli bir etkisi olmadığını göstermektedir. İlacın olumlu etkileri sadece sistolik fonksiyon parametreleri olan %EF ile %FS üzerinde gözlenmiştir ki, buradaki etkinlik de tek başına valsartan tedavisine üstün bulunmamıştır. Bu bulgular, bugüne kadarki literatür verileri ile örtüşmemektedir, nitekim hem kalp yetmezlikli hem de diabetik hayvan modellerinde birçok kardiyak parametrenin, üstelik valsartandan üstün olarak, LCZ696 ile düzeldiği ifade edilmektedir. Bu çelişkili sonuçları açıklamak için bu konuda yapılacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında yüksek yağlı diyet ve düşük doz STZ ile oluşturulan diabet modelinde LCZ696 isimli ilacın kardiyak β -AR aracılı yanıtlara etkisi ilacın içeriğinde bulunan valsartanla karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Yüksek yağlı diyet ve düşük doz STZ ile oluşturulan diabet modeli, tip 2 diabetik bireylerde gözlenen hiperglisemi, hiperlipidemi ve insülin rezistansı tablosunu en iyi yansıtan modeldir (Liu ve ark., 2016). Oluşturulan diabet modelinde kontrol sıçanlara oranla diabetik sıçanlarda gözlenen kilo kaybı, çelişkili görünmekle birlikte, oluşturulan model klinikte gözlenen tip 2 diabetin geç dönemi ile benzerlik göstermektedir (Davidson ve ark., 2018). LCZ696 ve valsartanın, önceki çalışmaların aksine metabolik parametreler üzerinde olumlu etkileri gözlenmemiştir. Aksine kan şekeri düzeyleri, tedavili gruplarda daha yüksek bulunmuştur. Bu durumun nedeni, çalışmanın başlangıcında hayvanların rastgeleleme yöntemi ile gruplara ayrılmış olması ve metabolik profili daha kötü olan sıçanların tedavili gruplarda yer alması ile açıklanabilir. Çalışmanın bu şekilde tasarlanmış olması ilaçların metabolik parametreler üzerindeki etkilerini yorumlamayı zorlaştırmaktadır.

Ekokardiyografi deneylerinde, diabette bozulan sistolik fonksiyon parametreleri üzerinde hem LCZ696 hem de valsartanın birbirlerine üstünlükleri bulunmaksızın olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir. *In vivo* PV loop analizlerinde ise, diabette gözlenen diyastolik disfonksiyon üzerinde her iki ilacın da iyileştirici etkisi bulunmamıştır. Kardiyak gevşeme yanıtlarında rol oynayan SERCA2a ve p-PLN/PLN protein ifalelenme düzeylerinin diabette azalmış olması ve tedavi yaklaşımlarıyla düzelmemesi, ilaçların oluşturulan diabet modelinde diyastolik disfonksiyon üzerinde olumlu etkileri olmadığını destekler niteliktedir.

Langendorff kalp preparasyonu deneylerinde β_3 -AR aracılı yanıtlar açısından gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir. Diabette arttığı bilinen β_3 -AR aracılı yanıtlar genelde tip 1 diabet modellerinde çalışılmıştır. Tip 2 diabet modelinde bu

yanıtların incelendiği tek bir çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmada da β_3 -AR aracılı yanıtların diabette değişmediği gösterilmiştir (Derkach ve ark., 2014). Bu durum, kalpte β_3 -AR aracılı yanıt değişiminin kullanılan diabet modelinden kaynaklanabileceğini akla getirmektedir. Papiller kasta β_1 - ve β_2 -AR aracılı yanıtların diabette azaldığı ve hem LCZ696 hem de valsartan tedavilerinin bu yanıtı iyileştirdiği gözlenirse de, elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışmanın başlangıcında yanlılığı önlemek adına, aykırı değerler için ortalama iki SS dışında kalması kuralı uygulanmıştır. Yeterli örnek sayısına ulaşıldığında, elde edilen geniş aralıklı verilerle analiz yapılmış ve SS'nin yüksek olması nedeniyle gruplar arası istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir. Bununla birlikte β_1 - ve β_2 -AR protein ifadenme düzeyleri çalışmamızda ölçülememiş ve değerlendirilememiştir.

Çalışmamızda LCZ696 tedavisi yüksek yağlı diyet ve düşük doz STZ ile oluşturulan diabet modelinde kardiyak fonksiyon üzerinde, yapılan prelinik ve klinik çalışmaların aksine, %EF ve %FS değerlerini iyileştirmesi dışında etkili bulunmamıştır. Sistolik fonksiyon parametreleri üzerindeki etkisi de valsartanla benzer bulunmuştur. İlacın diabette kardiyak β -AR yanıtlara etkisi ise ilk defa çalışmamızda incelenmiştir. İstatistiksel anlamlılık gözlenmese de, ilaç diabette azalan β_1 - ve β_2 -AR aracılı kasılma yanıtını iyileştirmiştir. Ne yazık ki, yapılan moleküler çalışmalarla bir sonuca ulaşılammış ve elde edilen veriler desteklenememiştir. Bu sonuçlardan hareketle, daha iyi valide edilmiş, farklı diabet modellerinde çalışılarak ve daha geniş kapsamlı moleküler çalışmalar yapılarak ilacın β -AR aracılı yolağ üzerine etkisi daha iyi anlaşılabilirdiği düşünülmektedir.

ÖZET

Valsartan/Sakubitril kombinasyonu LCZ696'nın diabetik kardiyak disfonksiyon üzerine olası etkilerinin beta adrenerjik yanıtverirlik üzerinden değerlendirilmesi

Diabet, insülin salıverilmesinde ve/veya insülin duyarlılığında azalmaya bağlı olarak ortaya çıkan kronik, endokrin bir hastalıktır. Hastalığa bağlı gelişen kardiyovasküler komplikasyonlar diabetik morbidite ve mortalitenin en önemli nedenidir. Diabette artan renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi aktivasyonu ve azalmış beta adrenerjik reseptör (β -AR) aracılı yanıtlar diabette kardiyak disfonksiyon oluşumunda rol oynayan önemli etkenlerdir. Diabette glisemik kontrolü sağlayan ilaçların yanı sıra diabete bağlı gelişen kardiyak hasarın önlenmesinde ve/veya tedavisinde kullanılacak ilaçların geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bir anjiyotensin reseptör blokörü olan valsartan ile bir neprilisin inhibitörü olan sakubitrilin kombinasyonu LCZ696 kalp yetmezliğinde kullanılan bir ilaçtır ve preklinik çalışmalarla diabetik kalp üzerindeki olumlu etkileri gösterilmiştir. Ne var ki, bu olumlu etkilerin altında yatan mekanizma kesin olarak belirlenememekle birlikte ilacın diabetik kalpteki etkilerini β -AR aracılı yolk üzerinden değerlendiren bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Bu noktadan hareketle, çalışmamızda LCZ696'nın diabetik kalpte β -AR aracılı yanıtlara etkisinin ilacın içeriğinde bulunan valsartanla karşılaştırmalı olarak değerlendirmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda altı haftalık erkek Sprague-Dawley sıçanlar, kontrol, diabetik, valsartan/sakubitril (68 mg/kg) tedavili diabetik ve valsartan (31 mg/kg) tedavili diabetik olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Diabet modeli, dört haftalık yüksek yağlı diyet uygulamasını takiben, ip düşük doz STZ (30 mg/kg) enjeksiyonu ile oluşturulmuştur. STZ uygulamasını takiben 14 haftalık diabet süresi sonunda *in vivo* ekokardiyografi, *in vivo* basınç-hacim 'loop' analizi yöntemleri ile kalbin sistolik/diyastolik fonksiyonu değerlendirilmiştir. *In vitro* Langendorff kalp preparasyonu ve papiller kas deneyleri ile ise ilacın sırasıyla β_3 -AR ile β_1 -ve β_2 -AR aracılı yanıtlara etkisi araştırılmıştır. Sonrasında, kardiyak fonksiyonda etkin rol oynayan çeşitli proteinlerin ifadenme düzeyleri Western Blot deneyleri ile değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler ortalama $\pm$ SD ile ifade edilmiştir. Gruplar arası karşılaştırma tek-yönlü ANOVA ve Bonferroni *post-hoc* testi ile yapılmış olup, istatistiksel analiz $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, çalışmamızda LCZ696'nın tek olumlu etkisi diabette bozulan sistolik disfonksiyon belirteçlerinden ejeksiyon fraksiyonu ve fraksiyonel kısalma üzerinde gözlenmiştir. Ne var ki, bu etki tek başına valsartan tedavisinden daha üstün bulunmamıştır. Bununla birlikte, diabette gözlenen diyastolik disfonksiyon üzerine her iki ilacın da olumlu bir etkisi bulunmamaktadır. LCZ696 ile diabette azalan β_1 -/ β_2 -AR aracılı yanıt kısmen iyileşse de, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Elde edilen bulgular ve daha önce yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, LCZ696'nın diabetik kalpteki etkilerinin anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya gereksinim olduğu açıktır.

Anahtar Sözcükler: Beta adrenerjik reseptör, Diabet, Kalp, LCZ696, Valsartan

SUMMARY

The evaluation of possible effects of valsartan/sacubitril combination LCZ696 on diabetic cardiac dysfunction in terms of β -adrenergic responsiveness

Diabetes is a chronic, endocrine disorder which results from reduced insulin secretion and/or insulin sensitivity. Cardiovascular complications are the major cause of diabetes-related morbidity and mortality. Increased renin-angiotensin-aldosterone system activity and decreased beta adrenergic receptor (β -AR) responsiveness are the important factors which contribute to diabetic cardiac dysfunction. In addition to the drugs to establish the glycemic control, it is crucial to develop drugs which are used for prevention and/or treatment of diabetic cardiac dysfunction. LCZ696 is a combination of valsartan, an angiotensin receptor blocker, and sacubitril, a neprilysin inhibitor. It has been approved for the treatment of heart failure. In preclinical studies, it has been shown that LCZ696 has beneficial effects on the diabetic heart, however underlying mechanisms remain unclear. The effect of LCZ696 on the diabetic heart through β -AR mediated signaling pathway has not been studied yet. In this regard, in the present study, it has been aimed to evaluate possible beneficial effect of LCZ696 on the diabetic heart in terms of β -AR responsiveness compared to valsartan.

In this study, 6-week old male Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups; control, diabetic, valsartan/sacubitril (68 mg/kg) treated diabetic and valsartan (31 mg/kg) treated diabetic. Diabetes was induced by low dose injection of STZ (30 mg/kg, ip) following 4-week high fat diet feeding. After 14 weeks of diabetes, cardiac systolic/diastolic function has been evaluated by using *in vivo* ecocardiography and *in vivo* pressure-volume loop analysis. The effect of both drugs on β_3 -AR and β_1 -/ β_2 -AR mediated responsiveness has been evaluated by using *in vitro* Langendorff preparation and *in vitro* papillary muscle experiments, respectively. Protein expression of genes which play role in the cardiac function was determined by Western Blot experiments. Data were expressed as mean $\pm$ SD. Multiple comparisons were performed one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

As a result, LCZ696 has been shown to have beneficial effects on systolic dysfunction in the diabetic heart through improving ejection fraction and fractional shortening. This effect was not superior to the one with valsartan alone. On the other hand, both treatment approaches did not show any favourable effect on diabetic diastolic dysfunction. β_1 -/ β_2 -AR mediated responsiveness was partially ameliorated by LCZ696 treatment. Nevertheless, this effect was not statistically significant. Regarding our current findings and previous data, it is clear that more comprehensive studies are needed to elucidate the effects of LCZ696 on the diabetic heart.

Keywords: Beta adrenergic receptor, Diabetes, Heart, LCZ696, Valsartan

KAYNAKLAR

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2019). Standarts of medical care in diabetes-2019. *Diabetes Care*, **42** (1).
- ARAGNO M, MASTROCOLA R, GHÉ C, ARNOLETTI E, BASSINO E, ALLOATTI G, MUCCIOLI G (2012). Obestatin induced recovery of myocardial dysfunction in type 1 diabetic rats: underlying mechanisms. *Cardiovasc. Diabetol.*, **11**: 129.
- ARBIN V, CLAPERON N, FOURNIÉ-ZALUSKI M-C, ROQUES BP, PEYROUX J (2003). Effects of dual angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase 24-11 chronic inhibition by mixanpril on insulin sensitivity in lean and obese Zucker rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **41**: 254-264.
- ARIOGLU-INAN, G KAYKI-MUTLU, BR ERDOGAN, AE MUDERRISOGLU, I KARAOMERLIOGLU, ZE YESILYURT, S DEGIRMENCI, B TURAN, ALTAN V (2017). The effects of leptin on cardiac function in streptozotocin diabetic rats. *BPS Pharmacology* 2017.
- ARIOGLU-INAN E, OZAKCA I, KAYKI-MUTLU G, SEPICI-DINCEL A, ALTAN VM (2013). The role of insulin–thyroid hormone interaction on β -adrenoceptor-mediated cardiac responses. *Eur. J. Pharmacol.*, **718**: 533-543.
- ATKINS FL, DOWELL RT, LOVE S (1985). beta-Adrenergic receptors, adenylate cyclase activity, and cardiac dysfunction in the diabetic rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **7**: 66-70.
- BADER M (2010). Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **50**: 439-465.
- BAGLIETTO-VARGAS D, SHI J, YAEGER DM, AGER R, LAFERLA FM (2016). Diabetes and Alzheimer’s disease crosstalk. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **64**: 272-287.
- BERLAN M, GALITZKY J, MONTASTRUC J (1995). Beta3- adrenoceptors in the cardiovascular system. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **9**: 234-239.
- BERLIN I, GRIMALDI A, BOSQUET F, PUECH AJ (1986). Decreased β -adrenergic sensitivity in insulin-dependent diabetic subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **63**: 262-265.
- BERS DM (2002). Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, **415**: 198-205.

- BIDASEE KR, ZHENG H, SHAO C-H, PARBHU SK, ROZANSKI GJ, PATEL KP (2008). Exercise training initiated after the onset of diabetes preserves myocardial function: effects on expression of β -adrenoceptors. *J. Appl. Physiol.*, **105**: 907-914.
- BOUDINA S, ABEL ED (2007). Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*, **115**: 3213-3223.
- BOWE JE, FRANKLIN ZJ, HAUGE-EVANS AC, KING AJ, PERSAUD SJ, JONES PM (2014). Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. *J. Endocrinol.*, **222**: G13-G25.
- BRODDE OE (1991). Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol. Rev.*, **43**: 203-42.
- BRODDE OE, MICHEL MC (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol. Rev.*, **51**: 651-90.
- CAMPESE VM, LASSETER KC, FERRARIO CM, SMITH WB, RUDDY MC, GRIM CE, SMITH RD, VARGAS R, HABASHY MF, VESTERQVIST O (2001). Omapatrilat versus lisinopril: efficacy and neurohormonal profile in salt-sensitive hypertensive patients. *Hypertension*, **38**: 1342-1348.
- CANNON JA, SHEN L, JHUND PS, KRISTENSEN SL, KØBER L, CHEN F, GONG J, LEFKOWITZ MP, ROULEAU JL, SHI VC (2017). Dementia- related adverse events in PARADIGM- HF and other trials in heart failure with reduced ejection fraction. *Eur. J. Heart Fail.*, **19**: 129-137.
- CARILLION A, FELDMAN S, NA N, BIAIS M, CARPENTIER W, BIRENBAUM A, CAGNARD N, LOYER X, BONNEFONT-ROUSSELOT D, HATEM S (2017). Atorvastatin reduces β -Adrenergic dysfunction in rats with diabetic cardiomyopathy. *PLoS One*, **12 (7)**: e0180103
- CHEN HH (2007). Heart failure: a state of brain natriuretic peptide deficiency or resistance or both! : *Journal of the American College of Cardiology*.
- COLAFELLA KMM, BOVÉE DM, DANSER AJ (2019). The renin angiotensin aldosterone system and its therapeutic targets. *Exp. Eye Res.*, **186**: 107680.
- CONNELLY K, KELLY DJ, ZHANG Y, PRIOR DL, MARTIN J, COX A, THAI K, FENELEY MP, TSOPORIS J, WHITE K (2007). Functional, structural and molecular aspects of diastolic heart failure in the diabetic (mRen-2) 27 rat. *Cardiovasc. Res.*, **76**: 280-291.

- DAAKA Y, LUTTRELL LM, LEFKOWITZ RJ (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature*, **390**: 88-91.
- DANIELS A, VAN BILSEN M, JANSSEN B, BROUNS A, CLEUTJENS J, ROEMEN T, SCHAART G, VAN DER VELDEN J, VAN DER VUSSE G, VAN NIEUWENHOVEN F (2010). Impaired cardiac functional reserve in type 2 diabetic db/db mice is associated with metabolic, but not structural, remodelling. *Acta physiologica*, **200**: 11-22.
- DANIELS LB, MAISEL AS (2007). Natriuretic peptides. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **50**: 2357-2368.
- DAVIDSON EP, COPPEY LJ, SHEVALYE H, OBROSOV A, YOREK MA (2018). Vascular and neural complications in type 2 diabetic rats: improvement by sacubitril/valsartan greater than valsartan alone. *Diabetes*, **67**: 1616-1626.
- DERKACH K, BONDAREVA V, MOYSEYUK I, SHPAKOV A (2014). The influence of two-month treatment with bromocryptine on activity of the adenylyl cyclase signaling system in the myocardium and testes of rats with type 2 diabetes mellitus. *Tsitologiya*, **56**: 907-918.
- DHALLA NS, LIU X, PANAGIA V, TAKEDA N (1998). Subcellular remodeling and heart dysfunction in chronic diabetes. *Cardiovasc. Res.*, **40**: 239-247.
- DİNÇER UD, GÜNER Ş, TAY A, ARIÖĞLU E, TAŞDELEN A, AŞLAMACI S, BİDASEE KR (2003). Decreased expression of β 1-and β 2-adrenoceptors in human diabetic atrial appendage. *Cardiovasc. Diabetol.*, **2**: 6.
- DİNÇER ÜD, BİDASEE KR, GÜNER Ş, TAY A, ÖZÇELİKAY AT, ALTAN VM (2001). The effect of diabetes on expression of β 1-, β 2-, and β 3-adrenoreceptors in rat hearts. *Diabetes*, **50**: 455-461.
- DİNÇER ÜD, ONAY A, ARİ N, ÖZÇELİKAY AT, ALTAN VM (1998). The effects of diabetes on β -adrenoceptor mediated responsiveness of human and rat atria. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **40**: 113-122.
- DOUST J, LEHMAN R, GLASZIOU P (2006). The role of BNP testing in heart failure. *Am. Fam. Physician*, **74**: 1893-1898.
- DUCKWORTH W, ABRAIRA C, MORITZ T, REDA D, EMANUELE N, REAVEN PD, ZIEVE FJ, MARKS J, DAVIS SN, HAYWARD R (2009). Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.*, **360**: 129-139.

- EINARSON TR, ACS A, LUDWIG C, PANTON UH (2018). Economic Burden of Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes: A Systematic Review. *Value Health*, **21**: 881-890.
- EMORINE LJ, MARULLO S, BRIEND-SUTREN MM, PATEY G, TATE K, DELAVIER-KLUTCHKO C, STROSBURG AD (1989). Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science*, **245**: 1118-21.
- ESSER N, ZRAIKA S (2019). Neprilysin inhibition: a new therapeutic option for type 2 diabetes? *Diabetologia*, 1-10.
- FERRARO S, FAZIO S, SANTOMAURO M, CIANFRANI M, MOSSETTI G, TURCO S, DE SIMONE G, GRAVINA E, MATERA MG, MARMO E (1990). Cardiac function and sympathetic activity in young diabetics. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **8**: 91-99.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2015). Center for drug evaluation and research. Erişim Adresi: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2015/207620Orig1s000OtherR.pdf] Erişim Tarihi: 4/5/2020.
- FOY J, LUCAS P (1976). Effect of experimental diabetes, food deprivation and genetic obesity on the sensitivity of pithed rats to autonomic agents. *Br. J. Pharmacol.*, **57**: 229-234.
- FRAMINGHAM HEART STUDY (1970-1979). Framingham Heart Study Bibliography – 1970's. Erişim Adresi: [https://framinghamheartstudy.org/fhs-bibliography/fhs-bibliography-1970s/] Erişim Tarihi: 26/2/2020.
- FU Q, HU Y, WANG Q, LIU Y, LI N, XU B, KIM S, CHIAMVIMONVAT N, XIANG YK (2017a). High- fat diet induces protein kinase A and G- protein receptor kinase phosphorylation of β_2 - adrenergic receptor and impairs cardiac adrenergic reserve in animal hearts. *The Journal of physiology*, **595**: 1973-1986.
- FU Q, WANG Q, XIANG YK (2017b). Insulin and β adrenergic receptor signaling: crosstalk in heart. *Trends Endocrinol. Metab.*, **28**: 416-427.
- FU S, PING P, WANG F, LUO L (2018). Synthesis, secretion, function, metabolism and application of natriuretic peptides in heart failure. *J. Biol. Eng.*, **12**: 2.
- FUSHIMI H, INOUE T, NAMIKAWA H, KISHINO B, NUNOTANI H, NISHIKAWA M, TOCHINO Y, FUNAKAWA S, YAMATODANI A, WADA H (1982). Decreased response of plasma catecholamine to stress in diabetic rats. *Endocrinol. Jpn.*, **29**: 593-596.

- GAUTHIER C, LANGIN D, BALLIGAND J-L (2000). β 3-Adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**: 426-431.
- GAUTHIER C, TAVERNIER G, CHARPENTIER F, LANGIN D, LE MAREC H (1996). Functional β 3-adrenoceptor in the human heart. *J. Clin. Invest.*, **98**: 556-62.
- GE Q, ZHAO L, LIU C, REN X, YU Y-H, PAN C, HU Z (2020). LCZ696, an Angiotensin Receptor-Neprilysin Inhibitor, Improves Cardiac Hypertrophy and Fibrosis and Cardiac Lymphatic Remodeling in Transverse Aortic Constriction Model Mice. *BioMed Research International*, **0**: 1-12.
- GE Q, ZHAO L, REN X-M, YE P, HU Z-Y (2019). LCZ696, an angiotensin receptor-neprilysin inhibitor, ameliorates diabetic cardiomyopathy by inhibiting inflammation, oxidative stress and apoptosis. *Exp. Biol. Med.*, **244**: 1028-1039.
- GEORGE MS, PITT GS (2006). The real estate of cardiac signaling: location, location, location. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**: 7535-6.
- GERSTEIN H, MILLER M, BYINGTON R, JR DG, GROUP ATCCRIDS (2008a). Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.*, **358**: 2545-2559.
- GERSTEIN HC, YUSUF S, HOLMAN RR, BOSCH J, INVESTIGATORS (2008b). Effects of ramipril and rosiglitazone on cardiovascular and renal outcomes in people with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: results of the Diabetes REduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication (DREAM) trial. *Diabetes Care*, **31**: 1007-1014.
- GÖTZSCHE O (1983). The adrenergic β -receptor adenylate cyclase system in heart and lymphocytes from streptozotocin-diabetic rats: in vivo and in vitro evidence for a desensitized myocardial β -receptor. *Diabetes*, **32**: 1110-1116.
- GROUP UKPDS UPDS (1998). Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *The lancet*, **352**: 837-853.
- GU J, NOE A, CHANDRA P, AL- FAYOUMI S, LIGUEROS- SAYLAN M, SARANGAPANI R, MAAHS S, KSANDER G, RIGEL DF, JENG AY (2010). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of LCZ696, a novel dual- acting angiotensin receptor—neprilysin inhibitor (ARNi). *The Journal of Clinical Pharmacology*, **50**: 401-414.
- GUYTON A, HALL J (2016). Textbook of Medical Pyhsiology (13. Baskı). Ed.: Elsevier. 995-996.

- HAAS AV, MCDONNELL ME (2018). Pathogenesis of Cardiovascular Disease in Diabetes. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, **47**: 51-63.
- HABIBI J, AROOR AR, DAS NA, MANRIQUE-ACEVEDO CM, JOHNSON MS, HAYDEN MR, NISTALA R, WIEDMEYER C, CHANDRASEKAR B, DEMARCO VG (2019). The combination of a neprilysin inhibitor (sacubitril) and angiotensin-II receptor blocker (valsartan) attenuates glomerular and tubular injury in the Zucker Obese rat. *Cardiovasc. Diabetol.*, **18**: 40.
- HALEY JM, THACKERAY JT, KOLAJOVA M, THORN SL, DASILVA JN (2015a). Insulin therapy normalizes reduced myocardial β -adrenoceptors at both the onset and after sustained hyperglycemia in diabetic rats. *Life Sci.*, **132**: 101-107.
- HALEY JM, THACKERAY JT, THORN SL, DASILVA JN (2015b). Cardiac β -adrenoceptor expression is reduced in Zucker diabetic fatty rats as type-2 diabetes progresses. *PLoS One*, **10**.
- HENNING RJ (2018). Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiol.*, **14**: 491-509.
- HOFFMAN BB, LEFKOWITZ RJ (1982). Adrenergic receptors in the heart. *Annu. Rev. Physiol.*, **44**: 475-84.
- HUISAMEN B, MARAIS E, GENADE S, LOCHNER A (2001). Serial changes in the myocardial β -adrenergic signalling system in two models of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Mol. Cell. Biochem.*, **219**: 73-82.
- INGEBRETSEN CG, HAWELU-JOHNSON C, INGBRETSSEN JW (1983). Alloxan-induced diabetes reduces beta-adrenergic receptor number without affecting adenylate cyclase in rat ventricular membranes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **5**: 454-461.
- INTERNATIONAL DIABATES FEDERATION (2017). IDF Diabetes Atlas. **8**: Brussels, Belgium
- INTERNATIONAL DIABATES FEDERATION (2019). IDF Diabetes Atlas. **9**: Brussels, Belgium
- INVESTIGATORS H (2000). Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *The lancet*, **355**: 253-259.
- JHUND PS, CLAGGETT B, PACKER M, ZILE MR, VOORS AA, PIESKE B, LEFKOWITZ M, SHI V, BRANSFORD T, MCMURRAY JJ (2014).

- Independence of the blood pressure lowering effect and efficacy of the angiotensin receptor neprilysin inhibitor, LCZ696, in patients with heart failure with preserved ejection fraction: an analysis of the PARAMOUNT trial. *Eur. J. Heart Fail.*, **16**: 671-677.
- JIA G, DEMARCO VG, SOWERS JR (2016). Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat. Rev. Endocrinol.*, **12**: 144-53.
- JIA G, HILL MA, SOWERS JR (2018). Diabetic cardiomyopathy: an update of mechanisms contributing to this clinical entity. *Circ. Res.*, **122**: 624-638.
- JIANG C, CARILLION A, NA N, DE JONG A, FELDMAN S, LACORTE J-M, BONNEFONT-ROUSSELOT D, RIOU B, AMOUR J (2015). Modification of the β -adrenoceptor stimulation pathway in Zucker obese and obese diabetic rat myocardium. *Crit. Care Med.*, **43**: e241-e249.
- JORDAN J, STINKENS R, JAX T, ENGELI S, BLAAK E, MAY M, HAVEKES B, SCHINDLER C, ALBRECHT D, PAL P (2017). Improved insulin sensitivity with angiotensin receptor neprilysin inhibition in individuals with obesity and hypertension. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **101**: 254-263.
- JULIUS S, KJELDSEN SE, WEBER M, BRUNNER HR, EKMAN S, HANSSON L, HUA T, LARAGH J, MCINNES GT, MITCHELL L, PLAT F, SCHORK A, SMITH B, ZANCHETTI A, GROUP VT (2004). Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet*, **363**: 2022-31.
- KANG G, BANERJEE D (2017). Neprilysin inhibitors in cardiovascular disease. *Curr. Cardiol. Rep.*, **19**: 16.
- KATZUNG B, TREVOR A (2015). Basic and Clinical Pharmacology (13. Baski). Ed.: FRASSETTO D, HENRIQUEZ RD. 723-724.
- KAUMANN AJ, ENGELHARDT S, HEIN L, MOLENAAR P, LOHSE M (2001). Abolition of (-)-CGP 12177-evoked cardiostimulation in double beta1/beta2-adrenoceptor knockout mice. Obligatory role of beta1-adrenoceptors for putative beta4-adrenoceptor pharmacology. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **363**: 87-93.
- KAUMANN AJ, MOLENAAR P (1997). Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **355**: 667-81.

- KAYAALP S (2012). Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji (13. Baskı). Ed.: KAYAALP S. 82.
- KAYKI-MUTLU G, ARIOGLU-INAN E, OZAKCA I, OZCELIKAY AT, ALTAN VM (2014). beta3-Adrenoceptor-mediated responses in diabetic rat heart. *Gen. Physiol. Biophys.*, **33**: 99-109.
- KAYKI-MUTLU G, KARAOMERLIOGLU I, ARIOGLU-INAN E, ALTAN VM (2019). Beta-3 adrenoceptors: A potential therapeutic target for heart disease. *Eur. J. Pharmacol.*, 172468.
- KENNY HC, ABEL ED (2019). Heart failure in type 2 diabetes mellitus: impact of glucose-lowering agents, heart failure therapies, and novel therapeutic strategies. *Circ. Res.*, **124**: 121-141.
- KITAMURA N, TAKAHASHI Y, YAMADATE S, ASAI S (2007). Angiotensin II receptor blockers decreased blood glucose levels: a longitudinal survey using data from electronic medical records. *Cardiovasc. Diabetol.*, **6**: 26.
- KLEINDIENST A, BATTAULT S, BELAIDI E, TANGUY S, ROSSELIN M, BOULGHOBRA D, MEYER G, GAYRARD S, WALTHER G, GENY B (2016). Exercise does not activate the β 3 adrenergic receptor–eNOS pathway, but reduces inducible NOS expression to protect the heart of obese diabetic mice. *Basic Res. Cardiol.*, **111**: 40.
- KOMPA AR, SUMMERS RJ (1999). Desensitization and resensitization of beta 1- and putative beta 4-adrenoceptor mediated responses occur in parallel in a rat model of cardiac failure. *Br. J. Pharmacol.*, **128**: 1399-406.
- KORYTKOWSKI MT, MOKAN M, VENEMAN TF, MITRAKOU A, CRYER PE, GERICH JE (1998). Reduced beta-adrenergic sensitivity in patients with type 1 diabetes and hypoglycemia unawareness. *Diabetes Care*, **21**: 1939-1943.
- KOSTIS JB, PACKER M, BLACK HR, SCHMIEDER R, HENRY D, LEVY E (2004). Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the Omapatrilat Cardiovascular Treatment vs. Enalapril (OCTAVE) trial. *Am. J. Hypertens.*, **17**: 103-111.
- KRISTENSEN SL, PREISS D, JHUND PS, SQUIRE I, CARDOSO JS, MERKELY B, MARTINEZ F, STARLING RC, DESAI AS, LEFKOWITZ MP (2016). Risk related to pre–diabetes mellitus and diabetes mellitus in heart failure with reduced ejection fraction: insights from prospective comparison of ARNI With ACEI to determine impact on global mortality and morbidity in heart failure trial. *Circ. Heart Fail.*, **9**: e002560.

- KUSAKA H, SUETA D, KOIBUCHI N, HASEGAWA Y, NAKAGAWA T, LIN B, OGAWA H, KIM-MITSUYAMA S (2015). LCZ696, angiotensin II receptor-neprilysin inhibitor, ameliorates high-salt-induced hypertension and cardiovascular injury more than valsartan alone. *Am. J. Hypertens.*, **28**: 1409-1417.
- LAMBERTS RR, LINGAM SJ, WANG H-Y, BOLLEN IA, HUGHES G, GALVIN IF, BUNTON RW, BAHN A, KATARE R, BALDI JC (2014). Impaired relaxation despite upregulated calcium-protein atrial myocardium from type 2 diabetic patients with preserved ejection fraction. *Cardiovasc. Diabetol.*, **13**: 72.
- LEE W-S, KIM J (2017). Diabetic cardiomyopathy: where we are and where we are going. *The Korean journal of internal medicine*, **32**: 404.
- LEHRKE M, MARX N (2017). Diabetes Mellitus and Heart Failure. *Am. J. Cardiol.*, **120**: S37-S47.
- LI J, NING Y, HEDLEY W, SAUNDERS B, CHEN Y, TINDILL N, HANNAY T, SUBRAMANIAM S (2002). The Molecule Pages database. *Nature*, **420**: 716-7.
- LIM HS, MACFADYEN RJ, LIP GY (2004). Diabetes mellitus, the renin-angiotensin-aldosterone system, and the heart. *Arch. Intern. Med.*, **164**: 1737-1748.
- LIU J, LIU Y, CHEN L, WANG Y, LI J (2013). Glucagon-like peptide-1 analog liraglutide protects against diabetic cardiomyopathy by the inhibition of the endoplasmic reticulum stress pathway. *Journal of diabetes research*, **2013**.
- LIU X-Y, LIU F-C, DENG C-Y, ZHANG M-Z, YANG M, XIAO D-Z, LIN Q-X, CAI S-T, KUANG S-J, CHEN J (2016). Left ventricular deformation associated with cardiomyocyte Ca²⁺ transients delay in early stage of low-dose of STZ and high-fat diet induced type 2 diabetic rats. *BMC Cardiovasc. Disord.*, **16**: 41.
- LIU X, SUZUKI H, SETHI R, TAPPIA PS, TAKEDA N, DHALLA NS (2006). Blockade of the renin–angiotensin system attenuates sarcolemma and sarcoplasmic reticulum remodeling in chronic diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1084**: 141-154.
- LIU X, XU Q, WANG X, ZHAO Z, ZHANG L, ZHONG L, LI L, KANG W, ZHANG Y, GE Z (2015). Irbesartan ameliorates diabetic cardiomyopathy by regulating protein kinase D and ER stress activation in a type 2 diabetes rat model. *Pharmacol. Res.*, **93**: 43-51.
- LUCHNER A, STEVENS TL, BORGESON DD, REDFIELD M, WEI C-M, PORTER JG, BURNETT JR JC (1998). Differential atrial and ventricular

- expression of myocardial BNP during evolution of heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **274**: H1684-H1689.
- MALEK V, GAIKWAD AB (2017). Neprilysin inhibitors: a new hope to halt the diabetic cardiovascular and renal complications? *Biomed. Pharmacother.*, **90**: 752-759.
- MALEK V, GAIKWAD AB (2019). Telmisartan and thiorphan combination treatment attenuates fibrosis and apoptosis in preventing diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.*, **115**: 373-384.
- MANGIAFICO S, COSTELLO-BOERRIGTER LC, ANDERSEN IA, CATALIOTTI A, BURNETT JR JC (2013). Neutral endopeptidase inhibition and the natriuretic peptide system: an evolving strategy in cardiovascular therapeutics. *Eur. Heart J.*, **34**: 886-893.
- MARR RA, GUAN H, ROCKENSTEIN E, KINDY M, GAGE FH, VERMA I, MASLIAH E, HERSH LB (2004). Neprilysin regulates amyloid β peptide levels. *J. Mol. Neurosci.*, **22**: 5-11.
- MARWICK TH, RITCHIE R, SHAW JE, KAYE D (2018). Implications of underlying mechanisms for the recognition and management of diabetic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **71**: 339-351.
- MATSUDA N, HATTORI Y, GANDO S, AKAISHI Y, KEMMOTSU O, KANNO M (1999). Diabetes-induced down-regulation of β 1-adrenoceptor mRNA expression in rat heart. *Biochem. Pharmacol.*, **58**: 881-885.
- MATYAS C, KOVACS A, NEMETH BT, OLAH A, BRAUN S, TOKODI M, BARTA BA, BENKE K, RUPPERT M, LAKATOS BK (2018). Comparison of speckle-tracking echocardiography with invasive hemodynamics for the detection of characteristic cardiac dysfunction in type-1 and type-2 diabetic rat models. *Cardiovasc. Diabetol.*, **17**: 13.
- MCDOWELL G, NICHOLLS DP (2000). The therapeutic potential of candoxatril, a neutral endopeptidase inhibitor, in humans. *Cardiovasc. Drug Rev.*, **18**: 259-270.
- MCMURRAY JJ, PACKER M, DESAI AS, GONG J, LEFKOWITZ MP, RIZKALA AR, ROULEAU JL, SHI VC, SOLOMON SD, SWEDBERG K (2014). Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N. Engl. J. Med.*, **371**: 993-1004.

- MISHRA PK, GIVVIMANI S, METREVELI N, TYAGI SC (2010). Attenuation of beta2-adrenergic receptors and homocysteine metabolic enzymes cause diabetic cardiomyopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **401**: 175-181.
- MIYOSHI T, NAKAMURA K, MIURA D, YOSHIDA M, SAITO Y, AKAGI S, OHNO Y, KONDO M, ITO H (2019). Effect of LCZ696, a dual angiotensin receptor neprilysin inhibitor, on isoproterenol-induced cardiac hypertrophy, fibrosis, and hemodynamic change in rats. *Cardiol J.*, **26**: 575-583.
- MOLINOFF PB (1984). Alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes properties, distribution and regulation. *Drugs*, **28 Suppl 2**: 1-15.
- MONIOTTE S, KOBZIK L, FERON O, TROCHU J-N, GAUTHIER C, BALLIGAND J-L (2001). Upregulation of β 3-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation*, **103**: 1649-1655.
- MOORADIAN AD, MORLEY JE, SCARPACE PJ (1988). The role of zinc status in altered cardiac adenylate cyclase activity in diabetic rats. *European Journal of Endocrinology*, **119**: 174-180.
- NAKAGAWA O, OGAWA Y, ITOH H, SUGA S-I, KOMATSU Y, KISHIMOTO I, NISHINO K, YOSHIMASA T, NAKAO K (1995). Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. Evidence for brain natriuretic peptide as an. *The Journal of clinical investigation*, **96**: 1280-1287.
- NEGISHI K (2018). Echocardiographic feature of diabetic cardiomyopathy: where are we now? *Cardiovascular diagnosis and therapy*, **8**: 47.
- NETTICADAN T, TEMSAH RM, KENT A, ELIMBAN V, DHALLA NS (2001). Depressed levels of Ca²⁺-cycling proteins may underlie sarcoplasmic reticulum dysfunction in the diabetic heart. *Diabetes*, **50**: 2133-2138.
- O'CONNOR CM, STARLING RC, HERNANDEZ AF, ARMSTRONG PW, DICKSTEIN K, HASSELBLAD V, HEIZER GM, KOMAJDA M, MASSIE BM, MCMURRAY JJ (2011). Effect of nesiritide in patients with acute decompensated heart failure. *N. Engl. J. Med.*, **365**: 32-43.
- PACKER M (2018). Augmentation of glucagon- like peptide- 1 receptor signalling by neprilysin inhibition: potential implications for patients with heart failure. *Eur. J. Heart Fail.*, **20**: 973-977.
- PACKER M, CALIFF RM, KONSTAM MA, KRUM H, MCMURRAY JJ, ROULEAU J-L, SWEDBERG K (2002). Comparison of omapatrilat and

enalapril in patients with chronic heart failure: the Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events (OVERTURE). *Circulation*, **106**: 920-926.

PACKER M, MCMURRAY JJ, DESAI AS, GONG J, LEFKOWITZ MP, RIZKALA AR, ROULEAU JL, SHI VC, SOLOMON SD, SWEDBERG K (2015). Angiotensin receptor neprilysin inhibition compared with enalapril on the risk of clinical progression in surviving patients with heart failure. *Circulation*, **131**: 54-61.

PALOMER X, PIZARRO-DELGADO J, VÁZQUEZ-CARRERA M (2018). Emerging actors in diabetic cardiomyopathy: heartbreaker biomarkers or therapeutic targets? *Trends Pharmacol. Sci.*, **39**: 452-467.

PARILLA JH, HULL RL, ZRAIKA S (2018). Neprilysin deficiency is associated with expansion of islet β -cell mass in high fat-fed mice. *J. Histochem. Cytochem.*, **66**: 523-530.

PERIN PC, MAULE S, QUADRI R (2001). Sympathetic nervous system, diabetes, and hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.*, **23**: 45-55.

POTTER LR, ABBEY-HOSCH S, DICKEY DM (2006). Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr. Rev.*, **27**: 47-72.

PRASAD T, ROKSNOER LC, ZHU P, VERMA A, LI Y, BATENBURG WW, DE VRIES R, DANSER AJ, LI Q (2016). Beneficial effects of combined AT1 receptor/neprilysin inhibition (ARNI) versus AT1 receptor blockade alone in the diabetic eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **57**: 6722-6730.

RESEARCH GROUP DCCT/EDIC (2016). Intensive diabetes treatment and cardiovascular outcomes in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC study 30-year follow-up. *Diabetes Care*, **39**: 686-693.

ROCKMAN HA, CHOI D-J, AKHTER SA, JABER M, GIROS B, LEFKOWITZ RJ, CARON MG, KOCH WJ (1998). Control of myocardial contractile function by the level of β -adrenergic receptor kinase 1 in gene-targeted mice. *J. Biol. Chem.*, **273**: 18180-18184.

ROKSNOER LC, VAN VEGHEL R, VAN GRONINGEN MCC-, DE VRIES R, GARRELDs IM, BHAGGOE UM, VAN GOOL JM, FRIESEMA EC, LEIJTEN FP, HOORN EJ (2016). Blood pressure-independent renoprotection in diabetic rats treated with AT1 receptor–neprilysin inhibition compared with AT1 receptor blockade alone. *Clin. Sci.*, **130**: 1209-1220.

- ROULEAU JL, PFEFFER MA, STEWART DJ, ISAAC D, SESTIER F, KERUT EK, PORTER CB, PROULX G, QIAN C, BLOCK AJ (2000). Comparison of vasopeptidase inhibitor, omapatrilat, and lisinopril on exercise tolerance and morbidity in patients with heart failure: IMPRESS randomised trial. *The Lancet*, **356**: 615-620.
- ROZEC B, GAUTHIER C (2006). β 3-Adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacol. Ther.*, **111**: 652-673.
- RÖSEN R, RUMP A, RÖSEN P (1995). The ACE-inhibitor captopril improves myocardial perfusion in spontaneously diabetic (BB) rats. *Diabetologia*, **38**: 509-517.
- RUBLER S, DLUGASH J, YUCEOGLU YZ, KUMRAL T, BRANWOOD AW, GRISHMAN A (1972). New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am. J. Cardiol.*, **30**: 595-602.
- SAVARESE JJ, BERKOWITZ BA (1979). β -Adrenergic receptor decrease in diabetic rat hearts. *Life Sci.*, **25**: 2075-2078.
- SEFEROVIC JP, CLAGGETT B, SEIDELMANN SB, SEELY EW, PACKER M, ZILE MR, ROULEAU JL, SWEDBERG K, LEFKOWITZ M, SHI VC (2017). Effect of sacubitril/valsartan versus enalapril on glycaemic control in patients with heart failure and diabetes: a post-hoc analysis from the PARADIGM-HF trial. *The lancet Diabetes & endocrinology*, **5**: 333-340.
- SELVIN E, MARINOPOULOS S, BERKENBLIT G, RAMI T, BRANCATI FL, POWE NR, GOLDEN SH (2004). Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.*, **141**: 421-431.
- SEMENIUK LM, KRYSKI AJ, SEVERSON DL (2002). Echocardiographic assessment of cardiac function in diabetic db/db and transgenic db/db-hGLUT4 mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **283**: H976-H982.
- SEMENOV A (2015). White paper: Natriuretic peptides, heart failure and LCZ696 (Entresto®). Erişim Adresi: [<https://www.hytest.fi/news/white-paper-natriuretic-peptides-heart-failure-and-lcz696-entresto-r>]. Erişim Tarihi: 6/6/2020.
- SHANG Y, ZHANG X, CHEN L, LENG W, LEI X, YANG Q, LIANG Z, WANG J (2016). Assessment of left ventricular structural remodelling in patients with diabetic cardiomyopathy by cardiovascular magnetic resonance. *Journal of diabetes research*, **2016**.

- SILVERTHORN DU (2016). Human Physiology an Integrated Approach (7. Baskı). Ed.: CHURCHMAN K. 740-742.
- SINGH JS, BURRELL LM, CHERIF M, SQUIRE IB, CLARK AL, LANG CC (2017). Sacubitril/valsartan: beyond natriuretic peptides. *Heart*, **103**: 1569-1577.
- SIVASANKAR D, GEORGE M, SRIRAM DK (2018). Novel approaches in the treatment of diabetic cardiomyopathy. *Biomed. Pharmacother.*, **106**: 1039-1045.
- SOLOMON SD, MCMURRAY JJ, ANAND IS, GE J, LAM CS, MAGGIONI AP, MARTINEZ F, PACKER M, PFEFFER MA, PIESKE B (2019). Angiotensin–neprilysin inhibition in heart failure with preserved ejection fraction. *N. Engl. J. Med.*, **381**: 1609-1620.
- SOLOMON SD, ZILE M, PIESKE B, VOORS A, SHAH A, KRAIGHER-KRAINER E, SHI V, BRANSFORD T, TAKEUCHI M, GONG J (2012). The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in heart failure with preserved ejection fraction: a phase 2 double-blind randomised controlled trial. *The Lancet*, **380**: 1387-1395.
- STANDEVEN KF, HESS K, CARTER AM, RICE GI, CORDELL PA, BALMFORTH AJ, LU B, SCOTT DJ, TURNER AJ, HOOPER NM (2011). Neprilysin, obesity and the metabolic syndrome. *Int. J. Obes.*, **35**: 1031-1040.
- SUEMATSU Y, JING W, NUNES A, KASHYAP ML, KHAZAELI M, VAZIRI ND, MORADI H (2018). LCZ696 (sacubitril/valsartan), an angiotensin-receptor neprilysin inhibitor, attenuates cardiac hypertrophy, fibrosis, and vasculopathy in a rat model of chronic kidney disease. *J. Card. Fail.*, **24**: 266-275.
- SUEMATSU Y, MIURA SI, GOTO M, MATSUO Y, ARIMURA T, KUWANO T, IMAIZUMI S, IWATA A, YAHIRO E, SAKU K (2016). LCZ696, an angiotensin receptor–neprilysin inhibitor, improves cardiac function with the attenuation of fibrosis in heart failure with reduced ejection fraction in streptozotocin- induced diabetic mice. *Eur. J. Heart Fail.*, **18**: 386-393.
- SUNDARESAN PR, SHARMA VK, GINGOLD SI, BANERJEE SP (1984). Decreased β -adrenergic receptors in rat heart in streptozotocin-induced diabetes: role of thyroid hormones. *Endocrinology*, **114**: 1358-1363.
- SYMEONIDES P, KOULOURIS S, VRATSISTA E, TRIANTAFYLLOU K, IOANNIDIS G, THALASSINOS N, KATRITSIS D (2007). Both ramipril and telmisartan reverse indices of early diabetic cardiomyopathy: a comparative study. *Eur. J. Echocardiogr.*, **8**: 480-486.

- TAMARGO M, TAMARGO J (2017). Future drug discovery in renin-angiotensin-aldosterone system intervention. *Expert opinion on drug discovery*, **12**: 827-848.
- TESHIMA Y, TAKAHASHI N, SAIKAWA T, HARA M, YASUNAGA S, HIDAKA S, SAKATA T (2000). Diminished expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine sensitive Ca²⁺ channel mRNA in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **32**: 655-664.
- TRIVEDI RK, POLHEMUS DJ, LI Z, YOO D, KOIWAYA H, SCARBOROUGH A, GOODCHILD TT, LEFER DJ (2018). Combined angiotensin receptor–neprilysin inhibitors improve cardiac and vascular function via increased bioavailability in heart failure. *Journal of the American Heart Association*, **7**: e008268.
- TURNER AJ, BROWN CD, CARSON JA, BARNES K 2002. The neprilysin family in health and disease. *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2*.
- TURNER AJ, ISAAC RE, COATES D (2001). The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopeptidases: genomics and function. *Bioessays*, **23**: 261-269.
- TYLER JM, TEERLINK JR (2017). The safety of sacubitril-valsartan for the treatment of chronic heart failure. *Expert opinion on drug safety*, **16**: 257-263.
- USHIJIMA K, ANDO H, ARAKAWA Y, AIZAWA K, SUZUKI C, SHIMADA K, TSURUOKA SI, FUJIMURA A (2017). Prevention against renal damage in rats with subtotal nephrectomy by sacubitril/valsartan (LCZ696), a dual- acting angiotensin receptor- neprilysin inhibitor. *Pharmacology research & perspectives*, **5**.
- UYAR-BOZTAS C, E ARIOGLU-INAN, AE MUDERRISOGLU, G KAYKIMUTLU, BR ERDOGAN, ZE YESILYURT, I KARAOMERLIOGLU, ALTAN V (2017). The effect of sitagliptin on beta-adrenoceptor-mediated cardiac responses in streptozotocin induced diabetic rats. *Diabetes Stoffwech H*, **26**: 15.
- VARDENY O, MILLER R, SOLOMON SD (2014). Combined neprilysin and renin-angiotensin system inhibition for the treatment of heart failure. *JACC: Heart Failure*, **2**: 663-670.
- VARDENY O, TACHENY T, SOLOMON S (2013). First- in- class angiotensin receptor neprilysin inhibitor in heart failure. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **94**: 445-448.
- VARMA U, KOUTSIFELI P, BENSON V, MELLOR K, DELBRIDGE L (2018). Molecular mechanisms of cardiac pathology in diabetes–Experimental insights.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, **1864**: 1949-1959.

VICKERY S, PRICE CP, JOHN RI, ABBAS NA, WEBB MC, KEMPSON ME, LAMB EJ (2005). B-type natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in patients with CKD: relationship to renal function and left ventricular hypertrophy. *Am. J. Kidney Dis.*, **46**: 610-620.

VOLPE M, CARNOVALI M, MASTROMARINO V (2016). The natriuretic peptides system in the pathophysiology of heart failure: from molecular basis to treatment. *Clin. Sci.*, **130**: 57-77.

VON LUEDER TG, WANG BH, KOMPA AR, HUANG L, WEBB R, JORDAAN P, ATAR D, KRUM H (2015). Angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 attenuates cardiac remodeling and dysfunction after myocardial infarction by reducing cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circ. Heart Fail.*, **8**: 71-78.

WALLUKAT G (2002). The beta-adrenergic receptors. *Herz*, **27**: 683-90.

WANG Q, LIU Y, FU Q, XU B, ZHANG Y, KIM S, TAN R, BARBAGALLO F, WEST T, ANDERSON E (2017). Inhibiting insulin-mediated β 2-adrenergic receptor activation prevents diabetes-associated cardiac dysfunction. *Circulation*, **135**: 73-88.

WATANUKI S, MATSUDA N, SAKURAYA F, JESMIN S, HATTORI Y (2004). Protein kinase C modulation of the regulation of sarcoplasmic reticular function by protein kinase A- mediated phospholamban phosphorylation in diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.*, **141**: 347-359.

WEBER MA (2001). Vasoepitidase inhibitors. *The Lancet*, **358**: 1525-1532.

WERNER RA, EISSLER C, HAYAKAWA N, ARIAS-LOZA P, WAKABAYASHI H, JAVADI MS, CHEN X, SHINAJI T, LAPA C, PELZER T (2018). Left Ventricular Diastolic Dysfunction in a Rat Model of Diabetic Cardiomyopathy using ECG-gated 18 F-FDG PET. *Sci. Rep.*, **8**: 1-6.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2019). Classification of diabetes mellitus 2019.

WILSON GA, WILSON LC, LAMBERTS RR, MAJEED K, LAL S, WILKINS GT, BALDI JC (2017). β -Adrenergic Responsiveness in the Type 2 Diabetic Heart: Effects on Cardiac Reserve. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **49**: 907-914.

WOLD LE, RELING DP, COLLIGAN PB, SCOTT GI, HINTZ KK, REN BH, EPSTEIN PN, REN J (2001). Characterization of contractile function in diabetic

- hypertensive cardiomyopathy in adult rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **33**: 1719-1726.
- WOO AY, XIAO RP (2012). beta-Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside. *Acta Pharmacol. Sin.*, **33**: 335-41.
- WU H, CHANG C, CHENG K, YEH C, CHENG J (2010). Increase of plasma insulin by racecadotril, an inhibitor of enkephalinase, in wistar rats. *Horm. Metab. Res.*, **42**: 261-267.
- WU L, WANG K, WANG W, WEN Z, WANG P, LIU L, WANG DW (2018). Glucagon-like peptide-1 ameliorates cardiac lipotoxicity in diabetic cardiomyopathy via the PPAR α pathway. *Aging cell*, **17**: e12763.
- WU T, DONG Z, GENG J, SUN Y, LIU G, KANG W, ZHANG Y, GE Z (2011). Valsartan protects against ER stress-induced myocardial apoptosis via CHOP/Puma signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **42**: 496-502.
- XIAO R-P, CHENG H, ZHOU Y-Y, KUSCHEL M, LAKATTA EG (1999). Recent advances in cardiac β 2-adrenergic signal transduction. *Circ. Res.*, **85**: 1092-1100.
- YARAS N, BILGINOGLU A, VASSORT G, TURAN B (2007). Restoration of diabetes-induced abnormal local Ca^{2+} release in cardiomyocytes by angiotensin II receptor blockade. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **292**: H912-H920.
- YUSUF S, OSTERGREN JB, GERSTEIN HC, PFEFFER MA, SWEDBERG K, GRANGER CB, OLOFSSON B, PROBSTFIELD J, MCMURRAY JV (2005). Effects of candesartan on the development of a new diagnosis of diabetes mellitus in patients with heart failure. *Circulation*, **112**: 48-53.
- ZHANG L, CANNELL MB, PHILLIPS AR, COOPER GJ, WARD M-L (2008). Altered calcium homeostasis does not explain the contractile deficit of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*, **57**: 2158-2166.
- ZHU W-Z, WANG S-Q, CHAKIR K, YANG D, ZHANG T, BROWN JH, DEVIC E, KOBILKA BK, CHENG H, XIAO R-P (2003). Linkage of β 1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca^{2+} /calmodulin kinase II. *The Journal of clinical investigation*, **111**: 617-625.
- ZHU W-Z, ZHENG M, KOCH WJ, LEFKOWITZ RJ, KOBILKA BK, XIAO R-P (2001). Dual modulation of cell survival and cell death by β 2-adrenergic

signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**: 1607-1612.



EKLER

Ek 1. Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onay Raporu



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 23/11/2016
TOPLANTI NO : 2016-23
DOSYA NO : 2016-52
KARAR NO : 2016-23-198

Doç.Dr.Ebru Anıoğlu İnan'ın 09.11.2016 tarihli dilekçesi 23.11.2016 tarihinde Kurulumuzca görüşülmüş, Yürütücülüğünü Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim üyelerinden Doç.Dr.Ebru Anıoğlu İnan'ın yaptığı, araştırmacı olarak Prof.Dr.Melih Altan, Prof.Dr.Alp Can, Dr.Gizem Kaykı Mutlu, Dr.Ferda Topal Çelikkın ve Ecz.Betül Rabia Erdoğan, Ecz.İrem Karaömerlioğlu ve Ecz.Elif Ayhanım Müderissoğlu'nun katıldığı "Valtarsan/Sakubitril Kombinasyonu LCZ696'nın Diyabetik Kardiyak Disfonksiyon Üzerine Olası Etkilerinin Beta Adrenerjik Yanıtverirlik Üzerinden Değerlendirilmesi" başlıklı araştırma projesinin aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sığır
Hayvan Sayısı : 114
Geçerlilik Süresi : 01/03/2017-01/10/2019

ETİK KURUL ÜYELERİ

Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünler Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K	
Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Betül Rabia
Soyadı: ERDOĞAN
Doğum yeri ve tarihi: Altındağ,1991
Uyruğu: T.C.
Medeni durumu: Bekar
İletişim adresi ve telefonu: Kardelen Mah. Dostlar Sitesi 2037. Cad.
B Blok İç Kapı No:2 Yenimahalle/ANKARA
05062853638

II- Eğitimi

Doktora Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı (2014-devam ediyor)
Lisans Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
(2009-2014)
Yabancı dili İngilizce

III- Ünvanları

Araştırma Görevlisi

IV- Mesleki deneyimi

Araştırma Görevlisi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı (2016-devam ediyor)

V- Üye olduğu bilimsel kuruluşlar

British Pharmacological Society
Türk Farmakoloji Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

Makaleler (Uluslararası)

Erdogan, BR, Vollert, J, Michel, MC. Choice of y-axis can mislead readers. *Naunyn Schmiedebergs Arch of Pharmacol.* 2020; 1-4.

Erdogan BR, Karaomerlioglu I, Yesilyurt ZE, Ozturk N, Muderrisoglu AE, Michel MC, Arioglu-Inan E. Normalization of organ bath contraction data for tissue specimen size: does one approach fit all?. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2020;393(2):243–251. doi:10.1007/s00210-019-01727-x

Yesilyurt ZE, Erdogan BR, Karaomerlioglu I, Muderrisoglu AE, Michel MC, Arioglu-Inan E. Urinary Bladder Weight and Function in a Rat Model of Mild Hyperglycemia and Its Treatment With Dapagliflozin. *Front Pharmacol.* 2019;10:911. Published 2019 Aug 16. doi:10.3389/fphar.2019.00911

Makaleler (Ulusal)

Kayki-Mutlu G, Yesilyurt ZE, Erdogan BR, Karaomerlioglu I, Muderrisoglu AE, Arioglu-Inan E, Nuray A. Epigallocateşin gallat (EGCG)’ın normal ve yüksek glukoz ortamında izole sıçan kardiyomiyositleri üzerindeki direct etkileri. *J Fac. Pharm. Ankara*, 2019, 43(1); 72-78.

Kitap Bölümü

Erdogan BR, Michel MC. Building Robustness into Translational Research. *Handb Exp Pharmacol.* 2020;257:163–175. doi:10.1007/164_2019_283

Bildiriler

Erdogan BR, Yeşilyurt ZE, Karaomerlioglu I, Muderrisoglu AE, Sevim K, Arioglu Inan E. “Does sacubitril/valsartan have an impact on cardiac function through beta-ARs in HFD low dose STZ diabetes model?”, Pharmacology 2019, Edinburgh, UK, December 15-17, 2019. (Poster)

Karaomerlioglu I, Yesilyurt ZE, Erdogan BR, Kaykı Mutlu G, Muderrisoglu AE, Altan VM, Arioglu Inan E. “Changes in β -adrenoceptor mediated responses and protein expression in dapagliflozin treated HFD and low dose STZ diabetic rat heart”, CVOT Summit 2019, Munich, Germany, October 24-25, 2019. (Poster)

Yesilyurt ZE, Karaomerlioglu I, Erdogan BR, Oztürk G, Michel MC, Arioglu Inan E. (2019). “A pilot study on the cardiac effects of low-dose empagliflozin in STZinduced diabetic rats”, CVOT Summit 2019, October 24-25, 2019. (Poster)

Karaomerlioglu I, Erdogan BR, Kayki-Mutlu G, Yesilyurt ZE, Muderrisoglu AE, Ozturk N, Altan VM, Arioglu-Inan E “The effects of dapagliflozin treatment on cardiac parameters in high fat fed and low dose STZ induced diabetic rat”, Pharmacology 2018, London, UK, December 18-20, 2018. (Sözlü sunum)

Yesilyurt ZE, Erdogan BR, Karaomerlioglu I, Muderrisoglu AE, Michel MC, Arioglu-Inan E “A pilot study of the effect of mild hyperglycemia on urinary bladder relaxation by β - adrenoceptor agonists”, Pharmacology 2018, London, UK, December 18-20, 2018. (Sözlü sunum)

Erdogan BR, Karaomerlioglu I, Yesilyurt ZE, Ozturk N, Muderrisoglu AE, Arioglu-Inan E, Michel MC “Impact of normalization approaches for in vitro organ bath experiments in different rat tissues”, Pharmacology 2018, London, UK, December 18-20, 2018. (Sözlü sunum)

Ozturk N, Muderrisoglu AE, Karaomerlioglu I, Erdogan BR, Yesilyurt ZE, Arioglu-Inan E “The effects of dapagliflozin on vascular responses in high fat fed- low dose streptozocin induced diabetes model”, Pharmacology 2018, London, UK, December 18-20, 2018. (Poster)

Erdogan BR, Yesilyurt ZE, Karaomerlioglu I, Muderrisoglu AE, Arioglu-Inan E, Michel MC, “A comparison of normalization approaches for in vitro contraction experiments of urinary bladder”, International Continence Society 2018, Philadelphia, USA, August 28-31, 2018. (Pposter)

Yesilyurt ZE, Erdogan BR, Muderrisoglu AE, Karaomerlioglu I, Michel MC, Arioglu-Inan E, “A pilot study of urinary bladder relaxation by β -adrenoceptor agonists in a rat model of type 2 diabetes”, 10th Adrenoceptor Symposium, Shizuoka, Japan, June 28-30, 2018. (Sözlü sunum)

Kayki-Mutlu G, Yesilyurt ZE, Erdogan BR, Karaomerlioglu I, Muderrisoglu AE, “Effects of three different flavonoids on cardiac contractility under high glucose concentrations”, 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS 12), Ankara, Turkey, June 26-29, 2018. (Poster)

Muderrisoglu AE, Erdogan BR, Karaomerlioglu I, Michel MC, Arioglu-Inan E, “The normalization of contractile response in diabetic rat aorta”, 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS 12), Ankara, Turkey, June 26-29, 2018. (Poster)

Arioglu-Inan E, Kayki-Mutlu G, Erdogan BR, Muderrisoglu AE, Karaomerlioglu I, Yesilyurt ZE, Degirmenci S, Turan B, Altan VM, “The effects of leptin on cardiac function in streptozotocin diabetic rats”, Pharmacology 2017, London, UK, December 11-13, 2017. (Sözlü Sunum)

Kayki-Mutlu G, Muderrisoglu AE, Karaomerlioglu I, Erdogan BR, Altan VM, Arioglu-Inan E, “Regulation of Na⁺-K⁺ pump by β_3 -adrenergic receptors in aortas from noradrenaline-treated rats”, Pharmacology 2017, London, UK, December 11-13, 2017. (Sözlü Sunum)

Karaomerlioglu I, Kayki-Mutlu G, Ozturk N, Erdogan BR, Muderrisoglu AE, Yesilyurt ZE, Altan VM, Arioglu-Inan E, “The effect of dapagliflozin treatment on beta adrenoceptor-mediated responses in high fat fed diabetic rat heart”, 3rd CVOT Summit of the D&CVD EASD Study Group, Munich, Germany, October 26- 27, 2017. (Poster)

Uyar-Boztas C, Arioglu-Inan E, Muderrisoglu AE, Kayki-Mutlu G, Erdogan BR, Yesilyurt ZE, Karaomerlioglu I, Altan VM, “The effects of sitagliptin on beta adrenoceptor-mediated cardiac responses in streptozotocin induced diabetic rats”, 3rd CVOT Summit of the D&CVD EASD Study Group, Munich, Germany, October 26- 27, 2017. (Poster)

Muderrisoglu AE, Erdogan BR, Yesilyurt ZE, Uyar-Boztas C, Karaomerlioglu I, Altan VM, Arioglu-Inan E, “The effects of sitagliptin treatment on beta 3 adrenergic receptor mediated relaxation responses in streptozotocin-induced diabetic rat aorta”, 10th Diabetes and Cardiovascular Disease (D&CVD) EASD Study Group Annual Meeting, Milan, Italy, June 22-24, 2017. (Poster)

Arioglu-Inan E, Erdogan BR, Muderrisoglu AE, Karaomerlioglu I, Kayki-Mutlu G, Onay Besikci A, Altan VM, “The effect of leptin treatment on in vivo cardiac parameters of streptozotocin induced diabetic rat”, 9th Diabetes and Cardiovascular Disease (D&CVD) EASD Study Group Annual Meeting, Maffliers, Paris, France, June 30- July 2, 2016. (Poster)

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı Burslar

2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı (TÜBİTAK) (01/03/2015 – 30/09/2018)

Erasmus+ Programı Bursu, Institut für Pharmakologie - Universitätsmedizin
Mainz der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (01/04/2019 – 01/10/2019)
Erasmus Program Bursu, Università degli Studi di Catania, Facoltà di Farmacia
(Eylül 2012 – Şubat 2013)

Projeler

117S936, Tübitak 1002, Valsartan/Sakubitril Kombinasyonu LCZ696'nın
Diabetik Kardiyak Disfonksiyon Üzerine Olası Etkilerinin Beta Adrenerjik
Yanıtverirlik Üzerinden Değerlendirilmesi, Yürütücü: Erdoğan Betül Rabia,
Araştırmacı: Karaömerlioğlu İrem. 01/11/2017 - 08/02/2019.

17B0237003, AÜ BAP, Çeşitli Polifenolik Maddelerin Normal Ve
Hiperglisemik Koşullarda İzole Rat Kardiyomyositleri Üzerindeki Direkt
Kardiyak Etkileri, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel
araştırma projesi, Yürütücü: Kaykı Mutlu Gizem, Araştırmacı: Erdoğan Betül
Rabia, Araştırmacı: Arı Nuray, Araştırmacı: Yeşilyurt Zeynep Elif, 05/07/2017
- 05/03/2018.

17L0237002, AÜ BAP, Streptozotosin Diyabetik Sıçan Aortasında Beta 3-
adrenoseptör Aracılı Yanıtlara Sitagliptinin Olası Etkileri, Yükseköğretim
Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Yürütücü: Arıoğlu İnan
Ebru, Araştırmacı: Erdoğan Betül Rabia, Araştırmacı: Müderrisoğlu Ayhanım
Elif, 29/03/2017 - 29/03/2018

VIII-Diğer Bilgiler

Hakemlik Yaptığı Dergiler

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology

Katıldığı Eğitim Seminerleri

Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası Eğitim Programı

Eğiticilerin Eğitimi Sertifika Programı

Uluslararası Bilimsel Toplantılar

True data – how to produce high quality research results

10/03/2020-12/03/2020

Pharmacology 2019

18/12/2018 – 20/12/2018, Edinburgh/United Kingdom

2nd Preclinical Data Forum Workshop for Young Scientists “How to Make Preclinical Research Robust”

27/02/2019 - 01/03/2019, Athens/Greece

Pharmacology 2018

18/12/2018 – 20/12/2018, London/United Kingdom

Statistics for Experimental Life Scientists

16/10/2018 - 19/10/2018, Ankara/Turkey (taught by international faculty)

ISOPS-12 (International Symposium on Pharmaceutical Sciences)

26/06/2018 – 29/06/2018, Ankara/Turkey

Summer School 2017-Pharmacotherapy in The Hospital and Community Setting

30/07/2017 – 13/08/2017, Bandung/Indonesia

9th Annual Meeting of the Diabetes Cardiovascular Study Group of the EASD

29/06/2016 – 02/07/2016, Paris/France

ISOPS-11 (International Symposium on Pharmaceutical Sciences)

09/06/2015 – 12/06/2015, Ankara/Turkey

Ulusal Bilimsel Toplantılar

23. Ulusal Farmakoloji Kongresi

07/09/2015 – 10/09/2015, Ankara/Turkey

XI. Ankara Biotechnology Days

20/05/2015 – 21/05/2015, Ankara/Turkey