

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL DİYABETİK KARDİYOMİYOPATİDE**  
**DEPO BAĞIMLI KALSİYUM KANALLARININ**  
**HÜCRE İÇİ KALSİYUM DÜZENLENMESİNE**  
**ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Yasin GÖKÇE

DOKTORA TEZİ

2020-ANTALYA

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL DİYABETİK KARDİYOMİYOPATİDE**  
**DEPO BAĞIMLI KALSİYUM KANALLARININ**  
**HÜCRE İÇİ KALSİYUM DÜZENLENMESİNE**  
**ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Yasin GÖKÇE

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

**Prof. Dr. Nazmi YARAŞ**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2018-3670 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2020-ANTALYA

## TEŐEKKÜR

Bu tez çalıőması sırasında, bana elinden gelen gayreti gösteren, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Nazmi YARAŞ'a ilgi ve alakalarından dolayı sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında çalıőmakta olan, bilgi ve birikimlerini benden esirgemeyen baőtta Prof. Dr. Semir ÖZDEMİR olmak üzere tüm hocalarıma teőekkürü bir borç bilirim.

Tez çalıőmalarıma maddi kaynak sağlayarak tez çalıőmalarımın bir kısmını Cambridge niversitesinde gerçekleşmesine imkan tanıyan TÜBİTAK'a,

Tez çalıőmalarımın bir kısmını gerçekleőtirdiėim Cambridge niversitesinde çalıőmakta olan Dr. Taufiq Rahman'a,

Tez çalıőmalarım sürecinde katkı sağlayan Dr. Öğretim yesi Nihal ÖZTÜRK ERBOĞA'ya ve sevgili arkadaőlarım Kamil SAVAŐ, Betül DANIŞMAN, Orhan ERKAN'a

Son olarak, bu tez çalıőması süresince benden manevi desteklerini esirgemeyen ve beni sabırla sürekli destekleyen tüm aileme,

Teőekkürü bir borç bilir, Őukranlarımı sunarım.

## ÖZET

**Amaç:** Diyabetik kardiyomiyopati modelinde bozulan hücre içi  $Ca^{2+}$  regülasyonunda depo-bağımlı  $Ca^{2+}$  kanallarının (SOCC) nasıl bir rol aldığı ve anjiyotensin II reseptör blokörü olarak losartanın kronik olarak uygulanmasının SOCC akımlarından en iyi bilinen,  $Ca^{2+}$  salınımı ile aktive olan  $Ca^{2+}$  akımlarına ( $I_{CRAC}$ ) ve depo bağımlı  $Ca^{2+}$  girişi (SOCE) yolağında görev alan (Stim1-2, Orai1-3) proteinlere olan etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

**Yöntem:** H9C2 embriyonik kardiyomiyosit ve sıçan bazofilik lösemi (RBL-1) hücre hatları normal ve yüksek glikoz ortamında kültüre edilerek  $I_{CRAC}$  akımları ve hücre içi  $Ca^{2+}$  sinyalleri kaydedilmiştir. Sıçanlarda ise deneysel diyabet modeli streptozotocin (STZ, 50mg/kg) ile indüklendi. Losartan uygulaması Kontrol+Losartan (K+Los) ve Diabetes Mellitus+Losartan (DM+Los) gruplarına 30mg/kg olacak şekilde gavaj yoluyla 4 hafta boyunca uygulandı. Deney sürecinde izole edilen kardiyomiyositlerde voltaj kenetleme yöntemiyle  $I_{CRAC}$  akımları ölçüldü. Ayrıca SOCE yolağı proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin ölçümü western blot tekniği kullanılarak gerçekleştirildi.

**Bulgular:** Yüksek glikoz ortamında çoğaltılan RBL-1 ve H9C2 hücrelerde,  $I_{CRAC}$  akımlarının kontrol değerlerine göre arttığı, yetişkin sıçan kardiyomiyositlerde diyabetik durumda  $I_{CRAC}$  akımlarının kontrol değerlerine göre önemli ölçüde azaldığı, losartan tedavisinin ise bu değişimleri engellediği görüldü. Ayrıca SOCE proteinlerin ekspresyon seviyelerine bakıldığında Stim1, Stim2 ve Orai2 seviyeleri değişmezken, Orai1 ve Orai3 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin arttığı görüldü.

**Sonuç:** Bulgular SOC akımlarının kardiyomiyositlerde hücre içi  $Ca^{2+}$  regülasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Ayrıca diyabetik kardiyomiyopati durumunda bozulan renin-anjiyotensin sistemi (RAS) sistemi ile SOCE arasında bir bağlantı olabileceği düşünülmektedir. SOCE ve moleküler bileşenlerinin (STIM/Orai) kardiyomiyopati tedavisinde önemli bir hedef olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Diabetes Mellitus, SOCE, Orai, Stim

## ABSTRACT

**Objective:** In the diabetic cardiomyopathy model, it was aimed to investigate the role of SOCCs in the impaired intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  regulation and the effects of chronic application of losartan as an angiotensin II receptor blocker on  $I_{\text{CRAC}}$  currents and SOCE proteins.

**Method:** H9C2 and RBL-1 cell lines were cultured in normal and high glucose environment and SOCE were examined by voltage clamping method. In rats, streptozotocin (STZ 50mg / kg) was administered intraperitoneally to create an experimental diabetes model. One week after STZ administration, DM and DM+Los group animals' blood glucose values above 300mg/dL were separated from the others. For the K+Los and DM+Los groups, losartan was administered at 30mg / kg by gavage for 4 weeks. SOCE were measured by voltage clamping method in isolated cardiomyocytes during experiment. In addition, measurement of protein expression was carried out using the western blot technique.

**Results:** In RBL-1 and H9C2 cells grown in high glucose environment, it was observed that SOCE currents increased compared to control. It has been observed that chronically administered losartan returns this increase to control values. In adult rat cardiomyocytes, it was observed that SOC currents decreased in diabetic condition compared to control, and chronic losartan treatment returned these currents to control values. In addition, SOCE proteins were examined, it was observed that while Stim1, Stim2 and Oria2 levels did not change, the expression levels of Orai1 and Orai3 proteins were increased.

**Conclusion:** It is thought that SOCE may play an important role in the regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  regulation in cardiomyocytes, and there may be a connection between the renine-angiotensin system (RAS) and SOCE in case of diabetic cardiomyopathy. SOCE and its molecular components (STIM1/Orai1, Stim1/Orai1/TRPC) are thought to be a new therapeutic target for patients with diabetic complications.

**Key words:** Diabetes Mellitus, SOCE, Stim, Orai

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>iii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>v</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>vi</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	<b>vii</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Kalp Döngüsüne Genel Bakış	3
2.2. Kalbin Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi	3
2.3. Depo Bağımlı Ca <sup>2+</sup> Kanalları (SOCC)	4
2.4. Kardiyak Kasında SOCE	6
2.5. Kardiyomiyositlerde SOCC ve Rolü	7
2.6. Diabetes Mellitus	9
2.7. Deneysel Diyabet	
2.8. SOCE ve Diyabetik Kardiyomiyopati	11
2.9. Renin-Anjiyotensin Sistemi	14
2.10. Ang II ve Diabetes Mellitus	17
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>18</b>
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	18
3.2. Deneysel Diyabet Oluşturulması	18
3.3. Kardiyomiyosit Hücre İzolasyonu	18
3.4 Hücre Kültürü	19
3.5 SOCE Akımlarının (I <sub>SOCE</sub> ) Ölçümü	20
3.6 Kardiyomiyositlerde Hücre içi Serbest Ca <sup>2+</sup> sinyal Ölçümü	21
3.7 Protein Ekspresyonlarının Analizi	22
3.8 İstatiksel Analiz	23
3.9 Kullanılan Kimyasallar	23

<b>4. BULGULAR</b>	<b>24</b>
4.1. Hayvanların Genel Durumları	24
4.2 RBL-1 hücrelerinde SOC Akımları	25
4.3 RBL-1 ve H9C2 Hücrelerinden Elde edilen $Ca^{2+}$ Sinyal Görüntüleri	32
4.4. Deneysel Diyabetin Kardiyak Hücrelerde Depo Bağımlı $Ca^{2+}$ Kanal (SOC) Akımlarına Etkisi	28
4.5.SOCE Proteinlerinin Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi	36
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>39</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>46</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>48</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>66</b>

## TABLÖLAR DİZİNİ

**Tablo 4.1.** Deney gruplarının genel parametreleri

24



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kalp kası hücrelerinde hücre içi uyarılma kasılma çiftlenimi.	4
Şekil 2.2. Depo bağımlı kalsiyum kanallarının aktivasyon süreci.	6
Şekil 2.3. Kalp kasında SOCE'nin moleküler bileşenleri ve çalışma mekanizması.	7
Şekil 2.4. Renin anjiyotensin sistemi bileşenleri ve olası etki alanları.	15
Şekil 4.1. Deney hayvanlarının kalp ağırlığı/vücut ağırlığı değişimleri.	25
Şekil 4.2. RBL-1 hücrelerinden elde edilen $I_{CRAC}$ akımları.	26
Şekil 4.3. RBL-1 hücrelerine ait $I_{CRAC}$ akımlarını gösteren örnek traseler.	27
Şekil 4.4. RBL-1 hücreleri $I_{CRAC}$ akımlarının zamana göre değişim grafikleri.	28
Şekil 4.5. RBL-1 hücrelerine 2 $\mu$ M (Tg) eklenerek tetiklenen $Ca^{2+}$ sinyalleri.	33
Şekil 4.6. H9C2 hücrelerine 2 $\mu$ M Thapsigargin (Tg) eklenerek tetiklenen $Ca^{2+}$ sinyalleri.	34
Şekil 4.7. H9C2 hücrelerde BTP2'nin SOCE aktivasyonuna etkisi.	32
Şekil 4.8. Kardiyomiyositlerden elde edilen $I_{CRAC}$ akımlarının potansiyele göre değişim grafikleri	35
Şekil 4.9. Çıkarılmış $I_{CRAC}$ akımlarına ait I-V grafikleri.	30
Şekil 4.10. Tüm gruplar için sıçan sol ventrikül hücrelerinden elde edilen $I_{CRAC}$ akımlarının zamana göre değişim grafikleri.	31
Şekil 4.11. Tüm deney grupları için SOC kanal proteinlerinin western blot görüntü örnekleri ve protein ekspresyon analizleri.	37

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>ACE</b>	: AngII Dönüştürücü Enzim
<b>ARB</b>	: AngII Reseptör Blokörü
<b>AT1R</b>	: AngII Tip1 Reseptörü
<b>CaMKII</b>	: Ca <sup>2+</sup> /Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz II
<b>DAG</b>	: Diaçilgliserol
<b>DM</b>	: Diabetes Mellitus
<b>ER</b>	: Endoplazmik Retikulum
<b>GPCR</b>	: G Proteine Bağlı Reseptör
<b>HF</b>	: Kalp Yetmezliği
<b>IP3</b>	: İnositol 1,4,5-trisfosfat
<b>IP3R</b>	: İnositol 1,4,5-trisfosfat Resptörü
<b>NCX</b>	: Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> Değiştokuşçusu
<b>PLB</b>	: Fosfolamban
<b>PLC</b>	: Fosfolipaz C
<b>PM</b>	: Plazma Membranı
<b>RBL-1</b>	: Sıçan Bazofilik Lösemi-1
<b>RyR</b>	: Riyanodin Reseptörü
<b>SA</b>	: Sinoatriyal
<b>SERCA</b>	: Sarko/Endoplazmik Retikulum Ca <sup>2+</sup> -ATPaz
<b>SOCC</b>	: Depo Bağımlı Ca <sup>2+</sup> Kanalları

<b>SOCE</b>	: Depo Bağımlı Ca <sup>2+</sup> Girişi
<b>SR</b>	: Sarkoplazmik Retikulum
<b>Stim</b>	: Stromal Etkileşim Molekülü
<b>Tg</b>	: Thapsigargin
<b>TRPC</b>	: Kanonikal Geçici Reseptör Potansiyel Kanal
<b>VDCC</b>	: Voltaj Bağımlı Ca <sup>2+</sup> Kanalı
<b>STZ</b>	: Streptozotosin
<b>2-APB</b>	: 2-Aminoetoksidifenil Borat

## 1. GİRİŞ

Endokrin sistem hastalığı olan diabetes mellitus son yıllarda ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Diabetes mellitus gelişimi ile birlikte aort, böbrek, retina ve kalp dahil olmak üzere çeşitli organ komplikasyonlarının ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Başlangıçta Rubler tarafından tanımlanan diyabetik kardiyomiyopati, hipertansiyon, koroner hastalık ve diğer etiyojiler yerine hiperglisemiden kaynaklanan ayırt edici bir kardiyomiyopati olarak tanımlanmaktadır (Rubler ve ark., 1972). Son çalışmalar, hipergliseminin kardiyomiyositlerde enerji kullanımını azaltarak ve plazma membranındaki iyon kanallarının işlevini bozarak kalbin elektrofizyolojik özelliklerini etkilediğini göstermiştir (Chiu ve ark., 2005; Savage ve ark., 2005; Haim ve ark., 2010). Sonuç olarak, iyon kanallarının işlev bozukluğu depolarizasyon genliğinde ve aritmi, kalp yetmezliği, kardiyojenik şok ve hatta ani ölümlere neden olan etki potansiyeli süresinin ve QT aralığının uzamasına neden olur (Casis ve Echevarria, 2004; Yuill ve ark., 2010).

Kritik bir ikincil haberci olarak, hücre içi  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ), kas kasılması, hücre uyarılabilirliği, motilite, apoptoz, proliferasyon ve diğerleri de dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerle yakından ilişkilidir (Clapham, 2007). Diyabetik kardiyomiyopatide sol ventrikül disfonksiyonunun başlıca nedeni,  $[Ca^{2+}]_i$  homeostazının dengesizliği ve kardiyomiyositlerdeki bozulmuş endoplazmik retikulum (ER)/sarkoplazmik retikulum (SR) fonksiyonudur (Abe ve ark., 2002). Depo boşalmasına bağlı olarak gerçekleşen  $Ca^{2+}$  girişi (SOCE), hücrelerdeki hücre içi  $Ca^{2+}$  homeostazını düzenleyen yaygın bir sinyal yolağıdır (J. W. Putney, 2011). Hem uyarılabilir hem de uyarılmayan hücrelerde SOCE, çoğalma, gen ekspresyonu, kasılma ve sekresyon gibi çok sayıda kritik fonksiyonda yer alır (Venkatachalam ve ark., 2002; Berridge ve ark., 2003; Parekh ve Putney, 2005). SOCE'nin iki temel bileşeni olarak, ER/SR zarında bulunan STIM (stromal etkileşim molekülü), ER/SR'de  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunu algılamak için  $Ca^{2+}$  sensörü olarak görev alırken plazma membranındaki Orai,  $Ca^{2+}$  girişine aracılık eden  $Ca^{2+}$  kanalları oluşturur (Zhou ve ark., 2013). Bugüne kadar, Orai1, Orai2 ve Orai3 dahil olmak üzere üç Orai izoformu ve iki STIM izoformu, STIM1 ve STIM2 tanımlanmıştır (Pan ve ark., 2014). Literatüre göre, her üç Orai izoformunun da SOCE üzerine katkılarının olduğu gösterilmiştir. Bu izoformlardan Orai1'in SOCE üzerinde daha etkin olduğu

birçok hücre türünde yapılan çalışmalarca gösterilmiştir (Shuttleworth, 2012). Ek olarak STIM1, Orai kanalları ile etkileşime girerek SOCE'yi aktive edebilmektedir (Zhou ve ark., 2013). Ancak, STIM2'nin SOCE içindeki işlevi henüz yeterince açıklığa kavuşturulamamıştır. Bazı çalışmalarca STIM2'nin STIM1 tarafından başlatılan SOCE'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (Soboloff ve ark., 2006a; Brandman ve ark., 2007; Parvez ve ark., 2008; Bird ve ark., 2009). Tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında STIM1 ve Orai1'in SOCE'nin iki temel bileşeni olduğu görülmektedir (Parvez ve ark., 2008; J. W. Putney, 2013). Ayrıca son zamanlarda yapılan diğer bazı çalışmalar Orai1 ve STIM1'in kardiyomiyosit  $[Ca^{2+}]_i$  homeostazı (Wang ve ark., 2012; Collins ve ark., 2014) ve kardiyomiyosit hipertrofinin gelişiminde (Ohba ve ark., 2009; Luo ve ark., 2012; Chaudhari, Ruknuddin, ve ark., 2014) önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bu sonuçlar incelendiğinde Orai1 ve STIM1 proteinlerinin ters etkileri olduğu görülmektedir. Örneğin, Orai1 dilate kardiyomiyopatinin yavaşlatılmasında telafi edici bir etki gösterirken, STIM1 baskılanmasının kardiyomiyosit hipertrofini azaltabileceği görülmektedir. Bu nedenle, SOCE'nin kardiyomiyositlerdeki işlevi, özellikle hastalık durumlarında nasıl bir etkinlik gösterdiği tam olarak anlaşılamamıştır.

Bu tez çalışmasında diyabetik kalp hücrelerinde SOC kanal etkinlikleri ve SOCE proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin kontrol durumuna göre nasıl bir değişim gösterdiği incelenmiştir. Ayrıca fosfolipaz C yolağını aktive edip IP3 üretimine neden olan  $\alpha 1$  adrenerjik reseptör agonistleri, endotelin ve AngII molekülleri hücre içi  $Ca^{2+}$  seviyesinde yükselişe neden olmakta ve sonucunda ise pozitif inotropik cevaplar, aritmiler, iskemi-reperfüzyonu takip eden kardiyak hasarlar ve gen ekspresyonunda değişimler gerçekleşmektedir (Jalili ve ark., 1999; Liu ve ark., 1998; Mackenzie ve ark., 2002; Molkenin ve ark., 2001; Shao ve ark., 1998). Diyabetik kardiyomiyopati durumunda da artan AngII molekülünün diyastolde hücre içi  $Ca^{2+}$  düzeyini arttırdığı bilinmektedir. Çalışmamızda ayrıca artan AngII molekülünün SOCE mekanizması üzerindeki olası rolü veya AngII artışının SOC kanallarının aktive olmasına neden olarak hücre için  $Ca^{2+}$  homeostazını bozabileceği düşüncesiyle AngII reseptör blokörleri (ARB) kullanılarak SOC kanalları ve AngII/AT1 aksının diyabetik kardiyomiyopatideki ilişkisi incelenmiştir.

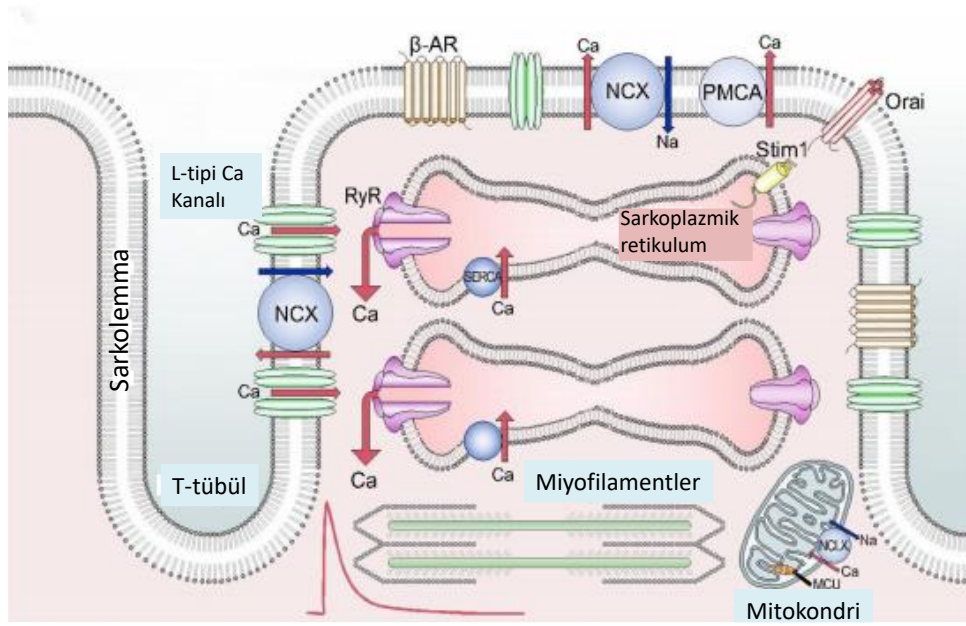
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kalp Döngüsüne Genel Bakış

Memeli kalbi sol ve sağ atriyumlar ve sol ve sağ ventriküller olmak üzere dört odadan oluşan karmaşık bir organdır. Oldukça koordineli bir dizi olayla, kalp kanı pulmoner ve sistemik vaskülatüre pompalar (Fukuta ve Little, 2008; Horton ve ark., 2014). Diyastol sırasında, dört oda da gevşer. Sistol, sağ atriyumun tepesinde bulunan sino-atriyal düğümünden, önce sağ ve sonra sol atriyumdan depolarize edici bir potansiyelin yayılmasıyla başlatılır. Bu depolarizasyon, atriyumların kasılmasını indükleyerek kanı ventriküllere gönderir. Daha sonra bu uyarı sırasıyla AV nod, His demetleri ve Purkinje lifleri üzerinden yayılarak tüm kalbin koordineli bir şekilde kasılmasına olanak sağlar. Depolarizasyon sinyalinin His-Purkinje sisteminden iletilmesi ventriküler sistollere neden olur. Kasılma dalgası, yukarı doğru ventriküler bazdan kanı pulmoner artere, daha sonra akciğerlere veya aorttan atardamar sistemine atar. Atriyum ve ventriküller arasındaki valflerle kanın geri akışı önlenir.

### 2.2. Kalbin Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi

Uyarılma kasılma çiftlenimi miyosit depolarizasyonunu mekanik kasılma ile eşleştiren işlemdir (Şekil 1.1.) Bu süreçte  $Ca^{2+}$  kritik bir araçtır. Aksiyon potansiyeli oluşmasıyla birlikte, her miyositin plazma zarı (sarkolemma) depolarize olur ( $\sim -80$  mV ila  $\sim +20$  mV), böylece voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının (VDCC) (“uzun süreli akım;” Cav1.2) açılmasına neden olur.  $Ca^{2+}$ , VDCC yoluyla sarkolemma ile “kavşak bölgesi” veya “çift yarık” olarak bilinen sarkoplazmik retikulum (SR) arasındaki sınırlı bir alana akar. Bir aksiyon potansiyeli sırasında  $Ca^{2+}$  iyonlarının birikmesi, bu mikro alanda  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunu 100 nM'dan 10 mM'a çıkarır. VDCC aktivasyonu sonucu oluşan bu temel  $Ca^{2+}$  akış sinyali “ $Ca^{2+}$  sparklet” olarak bilinir (Wang ve ark., 2001).  $Ca^{2+}$  sparkletleri tek başlarına kasılma için yeterli olmasa da  $Ca^{2+}$  indüklü  $Ca^{2+}$  salınımı (CICR) olarak bilinen SR depoları üzerinde bulunan tip 2 Ryanodin reseptörlerinin (RyR) açılması için yeterli olabilmektedir. Bir RyR kümesinin aktivasyonu ve bunun sonucunda SR'dan  $Ca^{2+}$ 'nın mobilizasyonu, temel bir  $Ca^{2+}$  salım sinyali olan “ $Ca^{2+}$  spark” ( $Ca^{2+}$  kıvılcım)'larının oluşumu sağlar (Cheng ve Lederer, 2008).



**Şekil 2.1.** Kalp kası hücrelerinde hücre içi uyarılma kasılma çiftlenimi. Bir aksiyon potansiyelinin başlamasıyla  $Ca^{2+}$  salınımı, kasılma ve sonrasında tekrar  $Ca^{2+}$  uzaklaştırılmasına bağlı olarak dinlenim sürecine dönüş (Eisner ve ark., 2017).

$Ca^{2+}$  iyonları, kasılma mekanizmalarını devreye sokmak için SR  $Ca^{2+}$  depolarından dışarıya doğru yayılır, böylece kana pompalama kuvveti sağlamak için hücre kısılması teşvik edilir. Tek bir aksiyon potansiyeli (AP) sırasında binlerce  $Ca^{2+}$  spark bölgeleri aynı anda kendi  $Ca^{2+}$  sparklet tetikleyicileri tarafından etkinleştirilir (Cheng ve Lederer, 2008).  $Ca^{2+}$  iyonlarının salınımları ve müteakip uzamsal ve zamansal toplamı global olarak  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunu 500nM'dan yaklaşık  $1\mu M$ 'a kadar yükselmesini sağlar. Kasılma filamentlerinin  $Ca^{2+}$  bağlayıcı bileşeni olan troponin C (TnC), bu aralığın üzerindeki  $Ca^{2+}$  konsantrasyonlarına duyarlıdır, böylece AP aracılı  $Ca^{2+}$  geçici cevapları ve buna bağlı kasılma çiftleniminin gerçekleşmesine olanak sağlar. Bir AP'nin sonunda ise  $Ca^{2+}$  transientleri,  $Ca^{2+}$ 'nın SERCA (SR  $Ca^{2+}$  pompası) ile SR içine ve NCX ( $Na^+/Ca^{2+}$  değiş tokuşçusu) ile hücre dışına atılmasıyla hızla sonlandırılır ve hücreler hızla diyastolik dinlenim durumuna geri dönerek bir sonraki kasılma için hazır hale gelir.

### 2.3. Depo Bağımlı $Ca^{2+}$ Kanalları (SOCC)

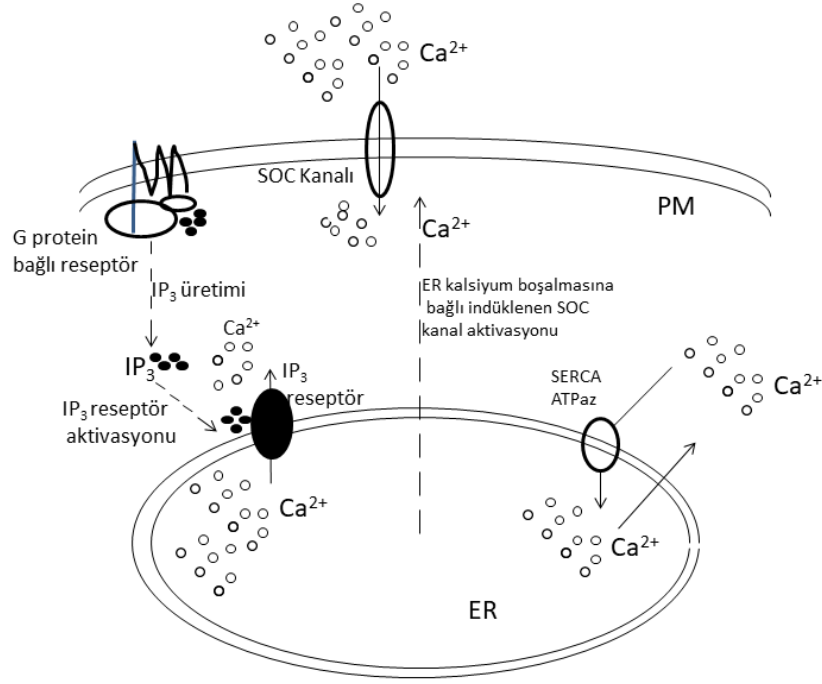
Kalsiyum, hücrelerin, dokuların ve organizmaların doğumunu, gelişimini, işlevini ve nihai ölümünü yönlendiren çeşitli biyolojik süreçlerin merkezinde bulunan, çok fonksiyonlu bir sinyal iyonudur. Hücreler,  $[Ca^{2+}]_i$  konsantrasyonunu

düzenleyebilmek için çeşitli taşıyıcılar ve kanallar kullanır. Neredeyse tüm metazoan hücrelerde bulunan en önemli  $Ca^{2+}$  kanallarından bir tanesi depo-bağımlı  $Ca^{2+}$  kanallarıdır. Aktivasyonları ER lümenindeki  $Ca^{2+}$  konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak gerçekleştiği için diğer tüm  $Ca^{2+}$  kanallarından farklıdır. İlk olarak uyarılamayan hücrelerde keşfedilse de şimdilerde iskelet kas hücresi, kalp kası hücresi ve nöron gibi uyarılabilen neredeyse tüm hücrelerde buldukları bilinmektedir (Parekh ve Putney, 2005). Fizyolojik olarak ER'den  $Ca^{2+}$  salınımına neden olan uyarılar SOC'ların aktivasyonunu sağlamaktadır. Bu süreç genellikle inositol 1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ ) ürettirebilecek olan fosfolipaz-C yolağını aktive eden reseptörleri içerir ve sonucunda ER üzerinde bulunan  $IP_3$  reseptörleri üzerinden  $Ca^{2+}$  salınımı tetiklenir veya  $Ca^{2+}$ -indüklü  $Ca^{2+}$  salınımı ile tetiklenen ER/SR RyR'den  $Ca^{2+}$  salınımı sonucunda aktive olurlar. Bu mekanizma Şekil 2.2'de görülmektedir.

ER  $Ca^{2+}$  konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak  $Ca^{2+}$  girişi ilk olarak 25 yıl önce Jim Putney tarafından “kapasitif kalsiyum girişi” olarak tanımlanmıştır (Putney, 2011). Hipotezlerinde  $Ca^{2+}$  girişi,  $IP_3$  artışından ziyade muskarinik agonistlerce ER depolarının boşaltılmasına bağlı olarak tetiklendiğini ileri sürmüşlerdir. Reseptörlerden ve  $IP_3$ 'den bağımsız olarak ER  $Ca^{2+}$  içeriğinin boşalmasına neden olan SERCA inhibitörü ve tek hücrelerde  $[Ca^{2+}]_i$  ölçülmesine olanak sağlayan Thapsigargin (Tg) kullanılması hücre içerisine giren depo bağımlı  $Ca^{2+}$  miktarının ölçülmesinde önemli bir yöntemdir (Thastrup ve ark., 1989). Tg-indüklü  $Ca^{2+}$  girişi daha sonrasında birçok hücre türünde gösterilmiştir (Targos ve ark., 2005).

Depo bağımlı  $Ca^{2+}$  girişi, STIM1 (stromal interaction molecule 1) ve Orai1 (a low conductance plasma/sarcolemmal  $Ca^{2+}$  channel) proteinlerinin varlığına ve etkileşimine bağlıdır. STIM1, ER/SR  $Ca^{2+}$  miktarına duyarlı bir proteindir. Depolardan  $Ca^{2+}$  salınımları, STIM1 kümelenmelerine ve ER'nin plazma membranına yakın bölgelerine doğru hareketlenmelerine neden olur. Bu bölgelerde STIM1 proteinlerinin  $Ca^{2+}$  seçici bir kanal olan Orai1 proteinleri ile fiziksel etkileşime geçmesiyle birlikte  $Ca^{2+}$  girişi tetiklenir. STIM1 ve Orai1 üzerinden gerçekleşen bu SOC akımı  $I_{CRAC}$  akımı olarak ifade edilir.





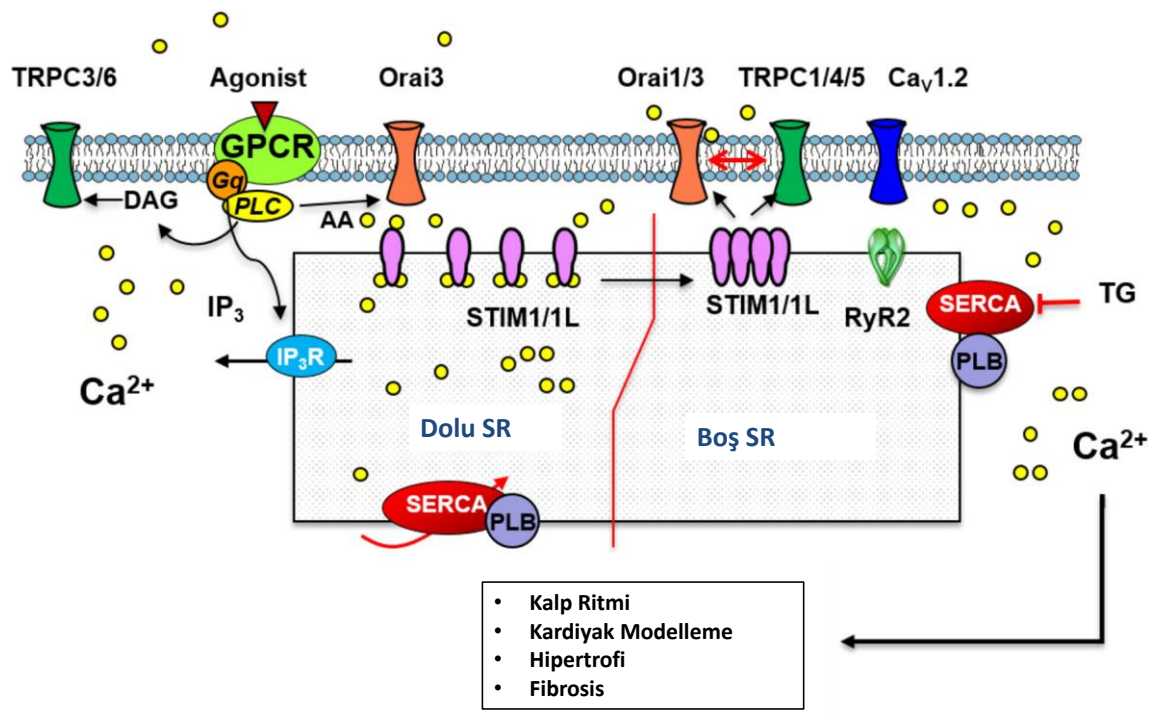
**Şekil 2.2.** Depo bağımlı kalsiyum kanallarının aktivasyon süreci.

SOCE, T lenfositleri gibi uyarılamayan ve iskelet kası hücreleri gibi uyarılabilir hücrelerde bulunduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Putney, Jr. ve Bird, 1993; Zhang ve ark., 2005; Stiber ve ark., 2008). STIM1 tek domaine sahip ER/SR membranını kapsayan lüminal  $Ca^{2+}$  duyarlı bir proteindir. Lüminal  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu düştüğünde ( $[Ca^{2+}]_{ER/SR}$  değerinin  $300 \mu M$ 'dan daha düşük olması durumunda) STIM1 proteinleri kümelenmeler oluşturarak Orail kanalının aktivasyonunu sağlar ve SOCE akım ( $I_{SOCE}$ ) girişi tetiklenir (Prakriya ve ark., 2006; Wu ve ark., 2006; Luo ve ark., 2012).  $I_{SOCE}$  için zıtlanma potansiyeli  $+50mV$  veya daha büyüktür.  $[Ca^{2+}]_{ER/SR}$  miktarı arttığı zaman bu süreç tersine dönmektedir.

#### 2.4. Kardiyak Kasında SOCE

Kardiyak uyarılma-kasılma çiftlenimi, sıkı bir şekilde düzenlenmiş  $Ca^{2+}$  akıları grubunca kontrol edilir. Sitozole  $Ca^{2+}$  girişi, VDCC ile hücre dışından ve hücre içindeki SR  $Ca^{2+}$  depolarından RyR vasıtasıyla gerçekleşir. Ortamdan  $Ca^{2+}$  uzaklaştırılması ise SERCA ile SR içerisine geri alınması veya PM'da bulunan  $Na^+/Ca^{2+}$  değiş-tokuşucusu (NCX) yardımıyla hücre dışına atılması ile gerçekleşir. Kardiyomiyositler her kalp atışından kaynaklanan büyük bir  $Ca^{2+}$  akısına sahip olmalarından dolayı başlangıçta bu hücrelerde SOCE varlığı göz ardı edilmiştir (Collins ve ark., 2013; Bootman ve Rietdorf, 2017). Aslında SOCE mekanizmasının

normal kardiyak fizyolojisine katkısı halen tartışma konusudur (Bootman ve Rietdorf, 2017). Ancak yapılan çalışmalardaki artış ile birlikte özellikle neonatal kardiyomiyositlerde SOCE varlığı gösterilmiştir (Bartoli ve Sabourin, 2017). SOCE, yeniden aktiveleştirilmiş fetal gen programı sırasında iyon kanallarının artışının bir sonucu olarak veya kronik kalp hastalığı gelişimi sırasında artan iyon kanalı aktivitesi nedeniyle ortaya çıktığı gösterilmiştir (Eder ve Molкетин, 2011; Hulot ve ark., 2011; Luo ve ark., 2012). Farklı çalışmalar, Tg veya G protein-bağlı reseptörleri (GPCR) aktive eden agonistler ile kardiyomiyositlerin uyarılmasının VDCC veya NCX inhibisyonuna duyarısız, ancak SOCE blokörlerine duyarlı olan kalıcı  $Ca^{2+}$  akımı oluşturduğu göstermiştir (Hunton ve ark., 2002; Uehara ve ark., 2002; Kojima ve ark., 2012). Fare sinoatriyal düğümünden izole edilen pacemaker hücrelerinde depo boşalmasına bağlı ciddi bir  $Ca^{2+}$  girişi tetiklenmekte ve uygulanan SOCE blokörlerinin spontan  $Ca^{2+}$  geçişlerinin genliğini ve sıklığını ve ayrıca SR  $Ca^{2+}$  depo içeriğini azaltıldığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2015).



**Şekil 2.3.** Kalp kasında SOCE'nin moleküler bileşenleri ve çalışma mekanizması. STIM1/1L; Orai1, SERCA, fosfolamban (PLB) ve RyR2 gibi SOCE'nin anahtar düzenleyicileri ile birlikte bulunur.

Şekil 2.3'te gösterildiği gibi, SOCE'nin standart moleküler bileşenlerinin (STIM1 ve ORAI1) kardiyomiyosit gelişimi, homeostaz ve gen transkripsiyonuna katıldıkları yetişkin, yeni doğan ve hücre kültürü kardiyomiyositlerinde gösterilmiştir (Ohba ve

ark., 2007; Voelkers ve ark., 2010; Hulot ve ark., 2011; Volkers ve ark., 2012; Zhu-Mauldin ve ark., 2012).

## 2.5. Kardiyomiyositlerde SOCC ve Rolü

STIM izoformları olan STIM1, STIM1L ve STIM2 yenidoğan ve yetişkin sıçan kardiyomiyositlerde eksprese edilmektedir. Ancak STIM2'nin kalpteki potansiyel rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. STIM1 ve STIM1L, yeni doğan ve yetişkin sıçan kalplerinde SERCA, fosfolamban ve RyR'ler gibi SOCE'nin anahtar düzenleyicileri ile birlikte eksprese edilmektedir (Horton ve ark., 2014; Correll ve ark., 2015; G. Zhao ve ark., 2015). SR Ca<sup>2+</sup> deplesyonu STIM1 kümelenmelerine ve sonucunda Orai1 ile etkileşimlerine neden olmaktadır. STIM1 ekspresyonunun azaltıldığı veya inhibe edildiği çalışmalarda hücre içine Ca<sup>2+</sup> girişinin azaldığı gözlemlenmiştir (Hulot ve ark., 2011; Luo ve ark., 2012). STIM1 proteini susturulmuş olan (siRNA) sıçan neonatal kardiyomiyositler üzerine yapılan çalışmalarda daha düşük diyastolik Ca<sup>2+</sup> seviyelerine ve azalmış SR Ca<sup>2+</sup> içeriğine yol açan sitozolik ve SR Ca<sup>2+</sup> işleyişini belirleyen spontan Ca<sup>2+</sup> geçişlerinin frekansında azalmalar görülmüştür (Voelkers ve ark., 2010).

Orai ailesinin üç üyesinin (Orai1, Orai2 ve Orai3) yenidoğan ve yetişkin sıçan kardiyomiyositlerde varlığı gösterilmiştir (Collins ve ark., 2013; Dominguez-Rodriguez ve ark., 2015; Sabourin ve ark., 2016). Orai2 ve Orai3'e göre Orai1'in kalpteki fizyo/patolojik rolü kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Birçok çalışmada Orai1'in SOCE'ye aktif olarak katıldığı ve aritmiler, kardiyak fibroz veya hipertrofi gibi hastalıkların gelişiminde önemli rol aldığı gösterilmiştir (Ruhle ve Trebak, 2013). Ayrıca, yeni doğan kardiyomiyositlerinde ve HL1 hücre kültürü Orai1 knockout çalışmalarda, TG ile indüklenen SOCE'nin yanı sıra hem sitozolik hem de SR Ca<sup>2+</sup> seviyelerini önemli ölçüde inhibe edildiği gösterilmiştir (Voelkers ve ark., 2010; Touchberry ve ark., 2011).

Kardiyomiyosit gibi uyarılabilir hücreler Ca<sup>2+</sup> salınımını RyR sayesinde CICR mekanizmaları ile SR Ca<sup>2+</sup> depolarından sağlasalar da InsP3 aracılı salınımın olduğu da bilinmektedir. Fonksiyonel IP<sub>3</sub> reseptörlerinin varlığı özellikle Purkinje liflerinde (Gorza ve ark., 1993) ve ayrıca kardiyomiyositlerde gösterilmiştir (Borgatta ve ark., 1991; Kijima ve ark., 1993; Moschella ve Marks, 1993). Ayrıca kalp yetmezliği

görülen hastalarda InsP3 mRNA seviyelerinin RyR'nin mRNA seviyelerine göre büyük oranda arttığı gösterilmiştir (Go ve ark., 1995). PLC yolağı üzerinden agonist-indüklü  $Ca^{2+}$  girişi hücre içi  $Ca^{2+}$  homeostazisinde uzun süreli değişimlere neden olmaktadır. Bu yolak  $\alpha 1$ -adrenerjik reseptörler, endotelin reseptörleri, anjiotensin II reseptörleri veya thrombin reseptörleri gibi Gq protein-bağı reseptörlerin uyarılmalarına bağlıdır ve sonrasında diyastolik  $[Ca^{2+}]_i$  artışı ile sonuçlanır. (Delbalzo ve ark., 1990; Eckel ve ark., 1991; Steinberg ve ark., 1991; Touyz ve ark., 1996). Bu sürecin sonucunda IP<sub>3</sub> reseptör-bağımlı yolak üzerinden diyastolik  $Ca^{2+}$  düzeyi artmaktadır ve dinlenim membran potansiyelini daha pozitif değerlere yükseltmektedir (Felzen ve ark., 1997).

SOCE immün hücreler ve endotelyal hücreler gibi uyarılmayan hücrelerde  $Ca^{2+}$  girişinin ana mekanizması olarak bilinmekteydi. Bu  $Ca^{2+}$  girişi daha sonra kardiyak miyosit, iskelet kas hücreleri ve nöronlar gibi uyarılabilir hücrelerde de keşfedildi. Şimdilerde ise SOCE oldukça fazla doku ve organ sisteminde çeşitli hücre sel fonksiyonları regüle eden  $Ca^{2+}$  sinyal yolağı olarak kabul edilmektedir. Bu yüzden SOCC'de meydana gelebilecek fonksiyon bozuklukları immün yetmezlik, miyopati ve vasküler hastalıklar gibi birçok bozukluklara neden olabilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda birçok diyabetik komplikasyonların temelinde SOCE'deki değişimler ve sinyal yolaklarındaki farklılaşmaların da önemli bir etken olarak gözüktüğü ortaya çıkmıştır (Molitch ve ark., 2015).

## **2.6. Diabetes Mellitus**

Diabetes mellitus (DM) önemli bir halk sağlığı sorunudur ve küresel nüfus için büyük bir problem haline gelmektedir. 2000 yılına kadar 285 milyon olan etkilenen kişi sayısının 2040 yılına kadar neredeyse 700 milyon kişiye yükseleceği tahmin edilmektedir (Shaw ve ark., 2010). DM, aşırı şekilde yükselmiş kan glikoz seviyelerini içeren metabolik bir hastalıktır. DM, genel olarak Tip 1 (T1DM) ve Tip 2 (T2DM) diyabet olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır. T1DM genelde çocuklarda veya ergenlerde görülürken, T2DM'nin kötü yaşam tarzı ve diyet seçenekleri nedeniyle uzun süreli hiperglisemi olan orta yaşlı ve yaşlı yetişkinleri etkilediği düşünülmektedir. T1DM ve T2DM için patogene z büyük ölçüde farklıdır ve bu nedenle her türün çeşitli etiyo lojileri, sunumları ve tedavileri vardır.

Pankreastaki Langerhans adacıklarında, insülin üreten beta hücreleri ve glukagon salgılayan alfa hücreleri olmak üzere endokrin hücrelerin iki ana alt sınıfı vardır. Beta ve alfa hücreleri, kan glikoz seviyesine bağlı olarak hormon salgılama düzeylerini sürekli olarak değiştirmektedir. İnsülin ve glukagon arasındaki denge bozulursa, glikoz seviyeleri de buna bağlı olarak bozulacaktır. DM durumunda, insülin ya yoktur ve/veya bozulmuş bir etkiye sahiptir (insülin direnci) ve bunun sonucunda hiperglisemi ortaya çıkmaktadır.

Juvenil diyabet veya insüline bağlı diyabet olarak da bilinen T1DM, vücudun pankreastaki beta hücrelerinin otoimmün yıkımı nedeniyle insülin üretememesi ile karakterize kronik bir hastalıktır. Kandaki insülin eksikliği, hücresel işlevler için enerji sağlamak üzere vücut hücreleri tarafından yetersiz miktarda glikoz alınması anlamına gelir. Sonuç olarak, glikoz kanda kalır ve yüksek kan şekeri seviyesine neden olur. Ayrıca kanda kalan yüksek glikoz seviyeleri aşırı idrara çıkma ve su kaybına neden olur ve vücut dokularına zarar verir. Tam olarak bağışıklık sisteminin bunu yapmasına neden olan faktörler henüz net olarak anlaşılmamış olsa da bazı hipotezler ortaya konmuştur. Bunlar kısaca şu şekilde sıralanabilir; a) Viral enfeksiyon - Bağışıklık hücreleri virüs partiküllerine karşı aktive olurken, pankreasın beta hücrelerine karşı da aktive olmaları; b) Genetik eğilim - Bazı HLA genotiplerinin T1DM gelişimine neden olmaları; c) Antikorların geliştirilmesi - inek sütündeki proteinlere karşı antikorların geliştirilmesinin, pankreasın beta hücrelerine saldıran antikorların geliştirilmesine de yol açabilmeleri (Rajaei ve ark., 2019).

T2DM, insülin seviyeleri ile insülin duyarlılığı arasındaki dengesizliğin, fonksiyonel bir insülin eksikliğine neden olduğu daha sinsiz bir başlangıç ile kendini gösterir. İnsülin direnci yaygın olarak obezite ve yaşlanma başta olmak üzere çok değişik nedenlerle ortaya çıkmaktadır. Bu diyabet formuna sahip hastaların çoğu obezdir ve obezitenin kendisi bir dereceye kadar insülin direncine neden olmaktadır. Plazma glikozu ve serbest yağ asitlerindeki artışın reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerini (Evans ve ark., 2005; Folli ve ark., 2011) arttırdığı ve bunun da mitojenle aktive edilen protein kinazlar (Kim ve Choi, 2010) ve nükleer faktör- $\kappa$ B (Sigala ve ark., 2011) gibi inflamasyon sinyal yollarını aktive ettiği düşünülmektedir. Bu inflamasyon basamaklarının aktivasyonunun insülin direncine neden olduğu ileri sürülmektedir (Muscogiuri ve ark., 2013).

## 2.7. Deneysel Diyabet

DM hastalığı dünya çapında büyük bir kitleyi etkileyen kronik bir metabolik bozukluktur. Hayvan diyabet modelleri, insan deneklerinde gereksiz ve etik açıdan zorlayıcı çalışmalardan kaçınılmasına ve bu hastalığın kapsamlı bir bilimsel bakış açısının elde edilmesine yardımcı olabilmesi yönünden diyabet araştırılmasında önemli bir araçtır. Diyabetin indüklenebileceği birkaç yöntem olmasına rağmen, alloksan ve streptozotosin (STZ) gibi kimyasal ilaçlar bu patolojik durumu indüklemek için en önemli ve oldukça tercih edilen deneysel modelleri temsil etmektedir. Alloksanın aksine, streptozotosin pH 7,4 ve 37 ° C'de en az 1 saat süreyle nispeten stabil olması sebebiyle daha çok tercih edilmektedir.

STZ (50 mg/kg) uygulaması pankreatik beta hücreleri dışındaki yapılara nispeten daha az zarar vermesinden dolayı diyabetik modelleri oluşturmak için daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Arison ve ark., 1967). Alloksan gibi STZ de bir hidrofilik bileşiktir ve GLUT2 taşıyıcıları yoluyla hücre zarını geçebilirler (Lenzen, 2008). STZ uygulamasından sonra, insüline bağımlı diyabet en az üç farklı etki mekanizması ile gelişir (Lenzen, 2008). Bu üç patolojik mekanizmanın hepsinde DNA yıkımı nihai sonuç olarak görülür. Bunlardan birincisi ve en önemlisi DNA alkilasyon hasarındır, bu aynı zamanda STZ kaynaklı diyabetin en olası mekanizmasıdır.

## 2.8. Diyabetik Kardiyomiyopati ve SOCE

Kalp yetmezliği ve buna bağlı morbidite ve mortalite, büyük ölçüde, yaşlanma, obezite ve DM'daki artışlar nedeniyle endişe verici bir oranda artmaktadır. Kalp yetmezliği ile ilişkili klinik sonuçlar, DM hastaları için DM olmayanlara göre önemli ölçüde daha kötüdür. DM olan kişilerde, açık klinik koroner arter hastalığı, kapak hastalığı ve hipertansiyon ve dislipidemi gibi diğer geleneksel kardiyovasküler risk faktörlerinin yokluğunda miyokard disfonksiyonunun varlığı, tanımlayıcı terminolojiye, diyabetik kardiyomiyopatiye yol açmıştır. Diyabetik kardiyomiyopatinin ilk aşaması klinik olarak asemptomatiktir ve artmış fibroz ve sertlik ile karakterizedir; erken diyastolik dolumun azalması ve atriyal dolum ve genişlemede artış ve ayrıca sol ventrikül diyastol sonu basınç artışı görülmektedir (Westermeier ve ark., 2016). Altta yatan patolojik faktörler arasında hiperglisemi,

sistemik ve kardiyak insülin direnci, artmış serbest yağ asidi (FFA) seviyeleri, sistemik ve doku iltihabı, oksidatif stres ve RAs ve sempatik sinir sisteminin aktivasyonu bulunur (Jia ve ark., 2016). Azalmış SERCA aktivitesinin neden olduğu verimsiz  $[Ca^{2+}]_{SR}$  döngüsü, kardiyak diyastolik disfonksiyonun gelişmesine önemli katkıda bulunur (Talukder ve ark., 2008).

Diyabetik kardiyomyopatinin ikinci aşaması, LV hipertrofisi, kardiyak yeniden modelleme, ilerleyen kardiyak diyastolik disfonksiyonu ve bunun sonucunda normal ejeksiyon fraksiyonu ile kalp yetmezliğinin klinik endikasyonlarının ortaya çıkması ile karakterizedir (Jia ve ark., 2016).

T2DM'daki diyabetik kardiyomyopatinin fenotipleri ve altta yatan mekanizmaları çoğunlukla db/db fareleri, ob/ob fareleri, Zucker diyabetik yağ sıçanları ve diyabetik hastalarda araştırılmıştır (Jia ve ark., 2016). T1DM'nin sistolik ve diyastolik fonksiyonlar üzerindeki etkisi daha karmaşıktır. T2DM'de olduğu gibi, T1DM durumunda diyastolik disfonksiyon sıklıkla görülür (Kanamori ve ark., 2015). T1DM'de diyabetik kardiyomyopatinin altında yatan mekanizmalar çoğunlukla birbirleri ile örtüşmektedir, ancak T2DM çalışmalarında farklı sonuçların bulunduğu dikkat çekmektedir (Holscher ve ark., 2016). Örneğin tip 1 Akita diyabetik farelerde yapılan bir çalışmada sistolik fonksiyonun korunduğu ve kalp hipertrofisinin ortaya çıkmadığı gözlenirken, diyabetik kalplerin kontrollere kıyasla daha çok küçüldüğü görülmüştür (Bugger ve ark., 2008). Kardiyomyosit otofajisi T1DM'de artarken T2DM'de baskılanmıştır (Kanamori ve ark., 2015). Tüm bu sonuçlar, T1DM ve T2DM diyabetik kardiyomyopati için fenotip ve altta yatan mekanizmalardaki potansiyel farklılıkları anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Diyabetik kalpteki kardiyomyositlerde kasılma aktivitesinde bozulmaya neden olan mekanizma, plazma membran glikoz taşıyıcı tip 4 (GLUT4) ve glikoz alımının azalması ve böylece SERCA aktivitesini düşmesi ve  $[Ca^{2+}]_i$  artmasıdır (Jia ve ark., 2016). Bu arada, anormal insülin metabolik sinyali ayrıca insülinle uyarılan koroner endotelial nitrik oksit (NO) sentaz (eNOS) aktivitesini azaltır ve NO üretimi kardiyomyosit  $[Ca^{2+}]_i$  duyarlılığını artırır ve sarkoplazmik  $Ca^{2+}$  alımını azaltır (Jia ve ark., 2016). NO biyoyararlanımının azaltılması da titin fosforilasyonuna yol açarak sert titin izoform N2B/N2BA ekspresyon oranını artırır. Bu patofizyolojik

anormallikler kardiyak sertliği arttırır ve diyabetik kardiyomiyopatinin en önmeli bulgularını ortaya koyar (Rosenkranz ve ark., 2003). Diğer ilgili anormallikler arasında hiperglisemi, insülin direnci ve  $\beta$ -miyozin ağır zinciri, insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü ve B tipi natriüretik peptit gibi birkaç kardiyomiyosit hipertrofik genin ekspresyonunu arttıran oksidatif stres yer alır (Jia ve ark., 2016). Yüksek insülin seviyeleri, insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörüne bağlanarak kardiyomiyosit hipertrofisini indükler. Kardiyomiyositler tarafından üretilen insülin benzeri büyüme faktörü 1, insülin reseptörü, hücre dışı sinyal ayarlı kinaz 1/2 (Erk1/2) ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) sinyal yollarıyla kardiyomiyosit hipertrofisini de uyarabilir (Sundgren ve ark., 2003).

Kardiyomiyositlerde SOCE'nin hipertrofik sinyal yolaklarının regülasyonunda önemli bir rol aldığı gösterilmiştir (Rosenkranz ve ark., 2003; Sundgren ve ark., 2003). Kardiyomiyositlerde STIM1 proteinindeki artış SOCE artışına neden olarak patolojik kardiyak hipertrofiye neden olmaktadır (Luo ve ark., 2012). Ancak diyabet indüklü kardiyak hipertrofiye SOCE'nin rolü üzerine çalışmalar oldukça sınırlıdır. Pang ve arkadaşları kısa süreli hipergliseminin Ang II veya TG ile stimüle edilen neonatal kültüre sıçan kardiyomiyositlerinde SOCE'yi azalttığını göstermişlerdir (Pang ve ark., 2002). Ayrıca hipergliseminin  $Ca^{2+}$  bağımlı hipertrofik cevapların ve kardiyak hipertrofiye rol aldığı oldukça iyi bilinen  $Ca^{2+}$  duyarlı NFAT (nuclear factor of activated T-cells) sinyal yolağını azalttığını göstermişlerdir. Bu kısa-süreli hiperglisemi etkisinin kalp için yararlı veya zararlı olup olmadığı kesin olarak anlaşılamamıştır. Uzun süreli hipertrofi sonunda kronik kalp yetmezliği ile sonuçlansa da, diyabetin ilk evrelerinde görülen kardiyak hipertrofi başlangıcı hemodinamik stres için adaptif bir mekanizma olabilir. Patofizyolojik olarak SOCE değişim mekanizmalarının diyabetik kardiyomiyopati gelişimindeki rolünün daha kapsamlı bir şekilde araştırılmaya ihtiyacı vardır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, hipergliseminin kardiyomiyositlerde enerji kullanımının azalmasına neden olarak ve plazma membranındaki iyon kanallarının işlevini bozarak kalbin elektrofizyolojik özelliklerini etkilediği göstermiştir (Chiu ve ark., 2005; Savage ve ark., 2005; Haim ve ark., 2010). İyon kanallarının fonksiyon bozukluklarının ise depolarizasyon genliğinde azalmaya, aksiyon potansiyeli süresinde ve QT intervalinde uzamaya neden olmaktadır. Bu tür bozukluklar ise aritmi, kalp yetmezliği, kardiyojenik şok ve hatta ani ölüm ile sonuçlanabilmektedir

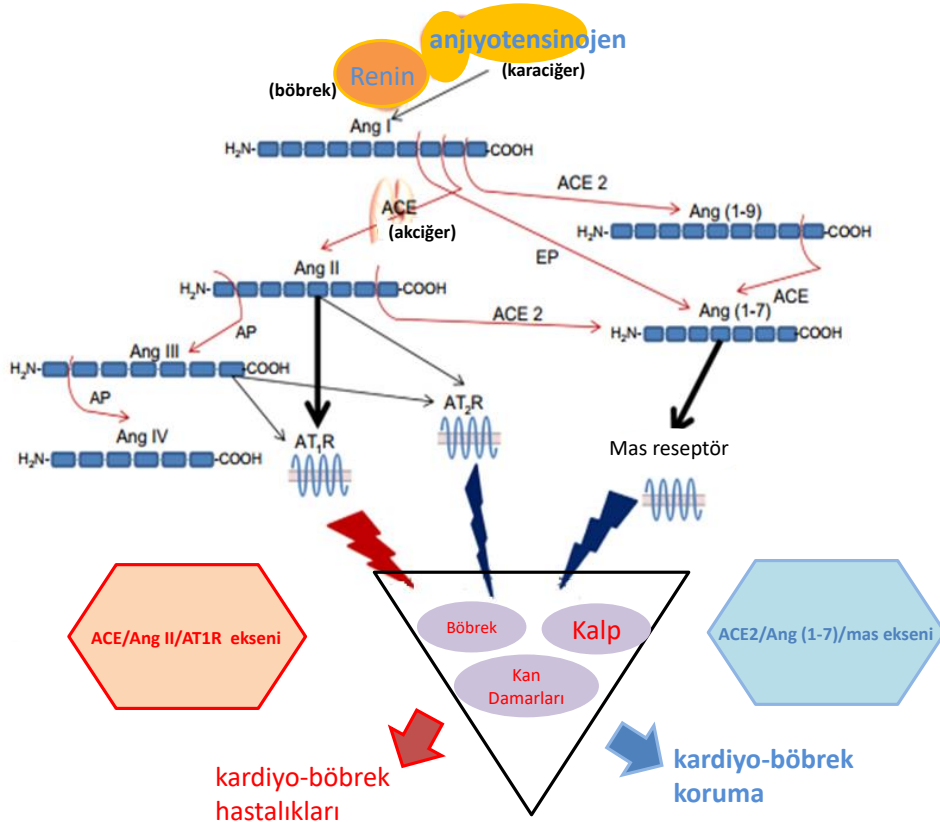


(Casis ve Echevarria, 2004; Yuill ve ark., 2010). İkincil haberci olarak kritik bir öneme sahip olan  $[Ca^{2+}]_i$  kas kasılması, hücre uyarılabilirliği, apoptosis, çoğalma gibi birçok önemli süreçte görev almaktadır (Clapham, 2007). Diyabetik kardiyomiyopatide sol ventrikül disfonksiyonunun başlıca sebepleri kardiyomiyositlerde  $[Ca^{2+}]_i$  homeostazın dengesizliği ve bozulmuş ER/SR fonksiyonudur (Abe ve ark., 2002). Kardiyomiyosit  $[Ca^{2+}]_i$  homeostazının (Wang ve ark., 2012; Chaudhari, Ruknuddin, ve ark., 2014; Collins ve ark., 2014) idame ettirilmesinde ve kardiyomiyositlerde hipertrofi gelişiminde (Ohba ve ark., 2009; Luo ve ark., 2012) Orai1 ve STIM1'in önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu nedenle, kardiyomiyositlerde SOCE'nin fonksiyonu, özellikle de hastalık durumlarında tam olarak anlaşılammıştır. Wang ve ark. yüksek glikoz ile kültüre edilmiş neonatal sol ventrikül kas hücrelerinde ve STZ-indüklü diyabetik yetişkin sıçan sol ventrikül hücrelerinde SOCE aktivitesi ve ekspresyon seviyelerindeki değişimleri incelemişlerdir. Her iki hücre grubu için de kontrol gruplarına göre SOCE girişinin arttığını göstermişlerdir. Ayrıca diyabetik sıçanlarda Orai1, Orai2 ve STIM1 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin istatistiksel anlamlılık gösterecek şekilde arttığını göstermişlerdir (Wang ve ark., 2017). Bu nedenle, SOCE mekanizmasının kardiyomiyositlerde nasıl bir rol aldığı ve özellikle diyabetik kardiyomiyopati durumunda nasıl bir değişim gösterdiği hala belirsizdir. Bu yüzden bu tartışmaların netleştirilebilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## **2. 9. Renin-Anjiyotensin Sistemi**

RAS sistemi, vücutta kan basıncının ve sıvı dengesinin düzenlenmesi için gerekli olan bir hormon sistemidir. Sistem esas olarak, renin, Ang II ve aldosteron olmak üzere üç hormondan oluşur. RAAS'ın ilk aşaması, renal jukstaglomerüler aparatın (JGA) granüler hücrelerinden salınan renin enzimidir. Anjiyotensinojen, karaciğerde üretilen ve renin tarafından anjiyotensin I'i oluşturmak üzere bölünen bir öncü proteindir. Anjiyotensin I daha sonra anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) tarafından Ang II'ye dönüştürülür. Bu dönüşüm esas olarak ACE'nin vasküler endotel hücreler tarafından üretildiği akciğerlerde meydana gelir, ancak ACE aynı zamanda renal endotel içinde daha küçük miktarlarda üretilir. RAS'ın fizyolojik ve patolojik rolleri çoğunlukla Ang II aracılığıyla ilgili reseptörleri üzerinden gerçekleşir. Bunlar, Ang II tip 1 reseptörü (AT1R) ve tip 2 reseptörüdür (AT2R). Her ikisi de GPCR reseptör ailesine aittir (Şekil 2.4). RAS sisteminin aşırı aktivasyonu

miyokard enfarktüsü (MI), kalp yetmezliği (HF), böbrek hastalığı ve inme gibi kronik komplikasyonların patogeneğinde merkezi bir noktadır (Ntountaniotis ve ark., 2011). RAS inhibisyonu, HF ve böbrek hastalıklarının ilerlemesinin yavaşlatılmasında önde gelen bir terapötik strateji haline gelen ACE inhibitörü (ACEI) ve/veya AT1R blokörünün (ARB) kullanımını içermektedir. ARB'ler birçok patolojik koşulların tedavisinde önem kazanmıştır. Olası bir avantajı AT1R'yi bloke ederek, AT2R üzerinde Ang II aktivitesini arttırmasıdır. Bu blokajın olası diğer bir pozitif etkisi ise Ang II'nin Mas reseptörüne etki eden ACE2 tarafından Ang (1-7) gibi RAS'ın diğer mediyatörlerine dönüşümünü etkilemesidir (Şekil 2.4). ACE2/Ang (1-7)/Mas'tan oluşan bu yeni eksenin, Ang II'nin patolojik rolüne karşı bazı yararlı eylemler üretebilmesi öngörülmektedir. RAS'ın yeni bileşenleri ve fonksiyonları çözümlenirken, odak şimdi damar içi hacim ve sistemik kan basıncının (BP) düzenlenmesi gibi RAS efektörlerinin klasik etkilerinden klasik olmayan eylemlerine kaymaktadır (Silva-Filho ve ark., 2011).



Şekil 2.4. Renin anjiyotensin sistemi bileşenleri ve olası etki alanları (Chappell, 2012).

$Ca^{2+}$  iyonlarının kardiyomiyosit kontraksiyonu için kritik rolü göz önüne alındığında bazı çalışmalar Ang-(1-7) etkinliğinin ventriküler kardiyomiyositlerde  $Ca^{2+}$

kullanımını nasıl etkilediği araştırmışlardır. Dias-Peixoto ve ark. yaptıkları çalışmada akut Ang (1-7) uygulamasının  $Ca^{2+}$  transient genlikleri veya kinetikleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını göstermişlerdir (Dias-Peixoto ve ark., 2008). Daha sonra yapılan transjenik rat çalışmasında kronik olarak arttırılmış plazmatik Ang (1-7)'nin sitozolik  $Ca^{2+}$  transient parametreleri üzerinde değişikliğe neden olmadığını göstermiştir (Gomes ve ark., 2010). Ancak Ang-(1-7)'nin Mas reseptörlerinin genetik olarak silindiği  $Mas^{-/-}$  fare kardiomyositlerinde daha küçük  $Ca^{2+}$  transientleri ve daha yavaş  $Ca^{2+}$  geri alımı gibi  $Ca^{2+}$  sinyal bozuklukları görülmüştür. Bu  $Ca^{2+}$  sinyal bozukluklarına SERCA2 protein seviyelerindeki azalmalar eşlik etmiştir. SERCA2, SR tarafından  $Ca^{2+}$  geri alınımına olanak sağlayan bir proteindir, bu yüzden  $Ca^{2+}$  salımında SR deposunun  $Ca^{2+}$  miktarı önemli bir ölçüttür (Bers, 2002). Bu tür mekanizmaların aydınlatılması, Ang II kaynaklı inflamasyon sürecini anlamaya ve bağışıklık temelli hastalıkların tedavi sonuçlarını iyileştirmeye yardımcı olabilecektir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar aynı zamanda kardiyomiopati, nefropati ve nöropati gibi diyabetik komplikasyonlar sırasında RAAS blokajının önemini vurgulamaktadır. Çeşitli kardiyak ve renal patolojilere karşı terapötik ajanlar olarak kullanılan ARB'lerden başlıcaları losartan, valsartan, irbesartan, candesartan cilexetil örnek olarak gösterilebilir.

Ang II'nin güçlü bir vazokonstriktör olduğu göz önüne alındığında, hipertansiyonu uzun süredir etkilediği bir çok çalışma ile gösterilmiştir (Schiffirin ve ark., 2003). Hipertansiyon tedavilerinde genel olarak ARB veya ACE inhibitörleri uygulamaları öne çıkmaktadır (Sowers ve ark., 2001). Bununla beraber kapsamlı klinik çalışmalar, ARB veya ACE inhibitörünün Ang II etkisini ortadan kaldırdığını ve pankreas  $\beta$  hücre fonksiyonunun korunması ve/veya insülin duyarlılığının iyileşmesinin "yüksek riskli" hastalarda T2DM oluşumunu %25 oranında azalttığı ve koruyucu mekanizmalar olduğu öne sürülmüştür (Hansson ve ark., 1999; Yusuf ve ark., 2000; Lindholm ve ark., 2002; Lithell ve ark., 2003; Pfeffer ve ark., 2003; Vermees ve ark., 2003).

## 2.10. Ang II ve Diabetes Mellitus

Tuzlu su homeostazında bilinen geleneksel rolünün dışında, insan patofizyolojisinde RAAS'ın rolü üzerine yapılan çalışmalarla birlikte, bu sistemin birçok hastalık ile yakından bağlantılı olduğu anlaşılmıştır (Pfeffer ve ark., 2003). Diyabette görülen RAAS aşırı aktivitesi RAAS inhibitörleri tedavisiyle geriye döndürülerek diyabetik komplikasyonların azaltılabileceği gösterilmiştir (Paul ve ark., 2006).

STZ ile indüklenen diyabetik sıçanlarda, miyosit başına Ang II reseptör bölgesi ile birlikte Ang II kardiyak doku seviyelerinin artışı gösterilmiştir (Connelly ve ark., 2007). Miktar ve sayıdaki bu değişiklik lokal ve dolaşımdaki RAS'tan bağımsız gibi görünmektedir (Fiordaliso ve ark., 2000). Ang II'nin sıçan kardiyak fibroblastlarında doza bağımlı bir şekilde kolajen sekresyonunu ve üretimini arttırdığı bildirilmiştir (Sechi ve ark., 1994). Dolayısıyla, artan matris birikimi, yüksek seviyelerde Ang II ve/veya reseptör yoğunluğunun bir sonucu olabilir. Ang II ayrıca diyabetik kalp hastalığında tespit edilen miyosit apoptozunda da rol oynar (Leri ve ark., 1998; Lijnen ve ark., 2000). Lokal RAS'ın yukarı regülasyonu, apoptoz ve nekrozu aktive edebilen ROS ve oksidatif stresin oluşumunda da rol almaktadır (Fiordaliso ve ark., 2001). Apoptozun aksine miyosit nekrozu, hücre dışı kompartmanların genişlemesine ve yaygın veya dağınık bir şekilde kolajen birikiminin artmasına neden olur.

Ang II ACE yolağından farklı bir yolak üzerinden üretilmesinden dolayı ARB'lerin ACE inhibitörlerine göre kullanımı daha fazla tercih edilmektedir (Frustaci ve ark., 2000). Ayrıca, ACE inhibitörleri ile yapılan kronik tedavinin, aldosteron seviyelerinin yükselmesine ve sonucunda Ang II reaktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Rincon-Choles ve ark., 2002).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deneyleerde kullanılmak üzere ağırlıkları 250-350g olan yaklaşık 3 aylık, 60 adet Wistar erkek türü sıçan çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurul onayı alınarak gerçekleştirilmiştir. Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden tedarik edilen sıçanlar, diyabet grupları için her kafeste en fazla 2 veya 3 hayvan, diğer gruplar için ise her kafeste 4 hayvan olacak olacak şekilde yem ve su kısıtlaması olmaksızın tutulmuşlardır.

Deneye alınan hayvanlar rastgele Kontrol (K) grubu, Diabetes Mellitus (DM) grubu, Diabetes Mellitus + Losartan (DM+Los) grubu ve Kontrol + Losartan (K+Los) grubu olacak şekilde 4 farklı gruba ayrılmıştır. Losartan uygulaması 30 mg/kg olacak şekilde K+Los ve DM+Los grubundaki hayvanlara 4 hafta boyunca izotonik salin içerisinde çözülerek gavaj yoluyla yapılmıştır. DM ve K grubundaki hayvanlara ise aynı süre zarfında gavaj yoluyla ağırlıklarına uygun olacak şekilde salin verilmiştir.

#### 3.2. Deneysel Diyabet Oluşturulması

Deneye alınan tüm hayvanların başlangıç itibariyle açlık kan şekeri ve vücut ağırlıkları ölçülmüştür. DM ve DM+Los hayvan gruplarını oluşturmak için, STZ (50 mg/kg) uygulaması intraperitoneal (*i.p.*) olarak tek doz enjekte edilmiştir. STZ enjeksiyonundan 1 hafta sonra hayvanların açlık kan şekeri düzeyleri tekrar ölçülerek, kan şekeri düzeyleri 300 mg/dl ve üzerinde olan hayvanlar diyabetik olarak kabul edilmiştir. K ve K+Los hayvanlarına ise sitrat (pH=4,5 sitrat tamponu) enjeksiyonu benzer şekilde *i.p.* olarak yapılmıştır. 1 hafta sonunda açlık kan şekeri değeri tekrardan belirlenip 4 hafta boyunca uygun koşullarda, tutulmuşlardır.

Glikoz seviyesi yüksek olan diyabet gruplarındaki hayvanların kan glikoz ve vücut ağırlıkları her hafta tekrar ölçülmüş ve 4 hafta sonrasında deneye alınmışlardır.

#### 3.3. Kardiyomiyosit Hücre İzolasyonu

Voltaj kenetleme metodu ile akımların kayıtları tek kardiyomiyositlerde yapılmıştır. Sıçanlar 50 mg/kg sodyum pento barbital anestezisi altında göğüsleri açılarak

kalpleri çıkartılmıştır. Çıkarılan kalpler hızlı bir şekilde Langendorff sistemine aorttan bağlanmıştır. İçeriği (mM olarak): 137 NaCl; 5,4 KCl; 1,5 CaCl<sub>2</sub>; 0,5 MgCl<sub>2</sub>; 11,8 HEPES; 10 glikoz ve pH 7,35 olan Tyrode ile kalp içindeki kan kısa bir süre içinde temizlenmiştir. Daha sonra kalpler içeriği (mM): 117 NaCl; 5,7 KCl; 4,4 NaHCO<sub>3</sub>; 1,5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 3,6 MgCl<sub>2</sub>; 20 HEPES; 10 Glikoz olan Ca<sup>2+</sup> içermeyen solüsyon ile perfüze edilmiştir. Bu işlemi takiben kalplere yaklaşık olarak 20-35 dk süre ile Ca<sup>2+</sup> içermeyen solüsyon ile hazırlanmış kollajenaz A (Worthington, Collagenase type 2) (1mg/ml) yine Langendorff sistemi ile belirli bir akış hızında uygulanmıştır. Kullanılan tüm solüsyonların pH dengesinin korunabilmesi için 10 dk gazlanmıştır. Kollojen yapısı parçalanan kalp daha sonra atriyumları ve diğer dokuları alınıp temizlenip küçük bir kaba alınarak Ca<sup>2+</sup> içermeyen solüsyon içerisinde makaslama yapılarak ince ince dilimlenmiştir. Parçalanan kalp dokusunun ince bir filtreden geçirilmesiyle elde edilen kardiyomiyositler Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonu sonunda 1 mM olacak şekilde kademeli olarak Ca<sup>2+</sup> içeriği artırılıp oda sıcaklığında bekletilmişlerdir. Adaptasyon sürecinden sonra hücreler oda sıcaklığında sürekli perfüze edilen hücre banyosu içine alınarak elektrofizyolojik kayıtlar gerçekleştirilmiştir.

### 3.4 Hücre Kültürü

Sıçan bazofilik lösemi-1 (RBL-1) hücreleri ve H9C2 embriyonik kardiyomiyosit hücreleri, %10 (v/v) fetal sığır serumu, 2 mM L-glutamin ve %1 (v/v) antibiyotik/antimikotik ile desteklenen F-12 besin karışımı ile düşük glikozlu (5,5 mM) veya yüksek glikozlu (50 mM) DMEM solüsyonu kullanılarak 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve % 95 hava ile nemlendirilmiş ortamda kültüre edildi. Hücreler 75 cm<sup>2</sup>'lik bir flaskta tutuldu ve ~%80 çoğalmaya ulaştıktan sonra haftada en az bir kez pasajlandı. RBL-1 ve H9C2 hücreleri 16. pasajın sonrasında kullanılmadı.

Hücreler pasaj yapılmadan önce DMEM ve tripsin solüsyonu 37 °C'ye önceden ısıtıldı. Flaskdaki hücre ortamı aspire edildi ve hücreler, 2-3 ml tripsin ilave edilerek flasktan ayrılmaları sağlandı. Yaklaşık 2-3 dakika sonra, yapışan hücrelerin tamamen ayrılmasına izin vermek için flasklar nazikçe çalkalanmasının ardından 8-10 ml DMEM ilave edilerek tripsin nötralize edildi. Hücre süspansiyonu daha sonra birkaç kez nazikçe pipetlendi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek süpernatantlar atıldı ve pelletler DMEM (1 ml) içinde yeniden süspanse edildi. Elde edilen hücre

süspansiyonu, hücrelerden akım kayıtları ve  $Ca^{2+}$  sinyal kaydı için gerektiği gibi plastik ve cam tabanlı tabaklar (10 mm) üzerine ekilmek suretiyle ilgili deneyler için kullanıldı. Son olarak diyabetik durumu bu hücrelerde de sağlayabilmek için kültüre hücreler plastik ve cam petrilere alınırken yüksek glikoz (50 mM) değerine sahip DMEM solüsyonu kullanılmıştır.

### 3.5 SOCE Akımlarının (ISOCE) Ölçümü

Tüm gruplar için SOCE akımlarının ölçümü tüm hücre voltaj kenetleme yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. 1.5-3 M $\Omega$ 'luk pipetler yardımıyla hücre-pipet yapışması sağlanıp pipet direnci G $\Omega$  mertebesine ulaşana kadar hafif negatif basınç uygulanmıştır. Daha sonra hücre membranları kırılarak SOC kanal akımları için belirlenmiş voltaj protokolü uygulanmıştır. Bunun için -80 mV'da tutulan hücrelerde  $Na^+$  akımlarını inhibe edebilmek için 40 ms süre ile -80 mV - +50m V aralığında ramp protokolü uygulanmıştır. Sonrasında +50 mV - -100 mV aralığı için 5 s süreli ramp protokolleri uygulanarak  $I_{CRAC}$  akımları ölçülmüştür. Ramp protokolü sonrası hücre tekrar dinlenim zar potansiyeli olan -80 mV değerine döndürülmüştür. 10-20 kayıt alındıktan veya akım değerleri sabitlendikten sonra thapsigargin (Tg, 3 $\mu$ M) yaklaşık olarak 10 dk süre ve kafein 5 s süre (10 mM) uygulaması ile kapiller borular aracılığıyla perfüze edilerek SR deposunun boşaltılması sağlanmış ve akım değerlerinin değişimleri gözlemlenmiştir. Tg uygulanmasından sonra SOCE blokörleri olan SKF96375 (50 $\mu$ M) veya 2-Aminoethoxydiphenly borate (2-APB, 50  $\mu$ M) yine perfüzyon sistemi vasıtasıyla uygulanmıştır. Banyo solüsyonunda normal Tyrode solüsyonu kullanılmıştır. Pipet solüsyonu için ise (mM); 137 Cs-Aspartat, 2 CsCl, 8 MgSO<sub>4</sub>, 15 HEPES, 5 EGTA, ve pH 7,2 CsOH ile ayarlanarak kullanılmıştır.  $K^+$  akımlarını bloke etmek için içeriği (mM) 150NaCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 Glikoz ve pH 7,4 olan dış solüsyon tüm-hücre modu itibariyle perfüzyon için kullanılmıştır. Ayrıca  $Ca^{2+}$  akımlarını bloke etmek için nifedipine (10  $\mu$ M) kullanılmıştır. Patch-clamp amplifikatörünün (Axon 200B, Molecular Devices, USA) voltaj kenetleme modunda 1 kHz'lik filtreden geçirilen SOCE akımları, Digidata 1200'ün 5 kHz'lik örnekleme hızında pClamp yazılımı (Axon Instrument, Foster City CA, USA) ile kaydedildi. Ayrıca seri direnç ( $R_s$ ) ve hücre kapasitans kompanzasyonu işlemleri Axon 200B amplifikatörü yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Akımların analiz işlemleri için ise Clampfit 10.2 programı kullanılmıştır.

-80 mV değerine tekabül eden akım değerleri ilgili hücrenin kapasitans değerine bölünerek akım yoğunlukları elde edildi. Her bir grup için ölçümler akım yoğunluğunun zamana göre değişimi olarak gösterildi.

### 3.6 RBL-1 ve H9C2 Hücre İçi Serbest $Ca^{2+}$ Sinyal Ölçümü

RBL-1 hücreleri ve H9C2 hücreleri 10 mm'lik cam tabanlı kaplara ekildi. Fura-2 asetoksimetil ester (Fura2-AM), 2 mM'lik bir stok konsantrasyonu hazırlamak için DMSO içerisinde %20 Pluronic® F-127 çözeltisi içerisinde çözüldü. Boya daha sonra Hank'in dengeli tuz çözeltisi (HBSS) tamponunu içeren  $Ca^{2+}$  (1.25 mM) içinde 3  $\mu$ M çalışma konsantrasyonuna seyreltildi. Hücreler, önceden ısıtılmış HBSS tamponu kullanılarak birkaç kez yıkandı. pH 7.4'te tutuldu. Hücreler petrilere kolayca ayrılabilirlikleri için taşınırken özel bir özen gösterildi. Daha sonra hücreler, karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 40 dakika süreyle yüklendi. Hücreler daha sonra boyayı ortamdaki çıkarmak için taze önceden ısıtılmış  $Ca^{2+}$  içeren tampona yıkandı ve hücreler içindeki tüm boyanın de-esterleşmesini sağlamak için 30 dakika süreyle taze takviye edilmiş HBSS tamponuna aktarıldı. Tüm deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. De-esterifikasyon aşamasından sonra hücreler  $Ca^{2+}$  içermeyen tampon ile yıkandı, hücreleri içeren petri kabı mikroskopa yerleştirildi ve ilk olarak  $Ca^{2+}$  içermeyen durumda görüntüleme başlatıldı. Başlangıç flüoresansı ilk olarak > 50 saniye süreyle kaydedildi, ardından 2  $\mu$ M Tg eklendi. ~ 10 dakika sonra, hücre dışı (banyo) solüsyonuna  $Ca^{2+}$  (2 mM) eklenmiş ve ~ 10 dakika sonra, banyo solüsyonuna 10  $\mu$ M iyonominin ve 1 mM  $MnCl_2$  eklenmiştir. Pozitif kontrol (Pyr6) ve test grubu için hücreler,  $Ca^{2+}$  görüntülemenin başlamasından önce 15 dakika boyunca istenen bileşik konsantrasyonu ile inkübe edilmiştir.

Floresan görüntüler, QImaging QIClick dijital CCD kamera ile monte edilmiş Nikon Eclipse Ti-S Mikroskop ve 10X (NA 0.25) hava hedefi kullanılarak kayıt edildi. Uyarma, hem 355 nm hem de 380 nm dalga boylu LED'ler arasında değişen bir Çift OptoLED Güç Kaynağı (Cairn, İngiltere) tarafından sağlandı. Fura-2 sinyalinin emisyon floresansı 510 nm'de (470 nm – 550 nm) toplandı. MetaFluor® (Molecular Devices, ABD) floresan oranı görüntüleme yazılımı ile her 5 saniyede bir 12 bitlik görüntüler elde edildi. Her bir zaman noktasındaki floresan, hem 355 nm hem de 380 nm dalga boyları için elde edildi, oto-floresans için düzeltildi ve 355 nm/380 nm oranları hesaplandı.



### 3.7 Doku Protein Düzeyi Analizi

Her bir gruptan alınan kalp dokuları sıvı nitrojen kullanılarak ezilip doku homojenatları çalışma için hazır hale getirildi. Hazırlanan homojenatlar içeriği (mM): 150 NaCl; 20 Tris HCl; 2 EDTA; 2 KCl; 1 Sodyum Orthovande; 20 NaF; 0,5 DDT; 1 EGTA; 100 Proteaz inhibitörü; 0,4 PMSF) olan homojenizasyon tamponuna konuldu. Sonrasında ince bıçaklı homojenizatör kullanılarak dokular parçalandı. Homojen hale getirilen örnekler 10,000×g'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatantlar toplandı. Bradford yöntemi kullanılarak tüm gruplara ait protein miktarları belirlendi. Sonrasında her bir grup için Stim1, Stim2, Orai1, Orai2 ve Orai3 protein ekspresyon seviyeleri western blotting tekniği kullanılarak belirlenmiştir.

Öncelikle ekspresyon seviyeleri ölçülecek proteinler için %8 veya %10 jel hazırlandı ve protein miktarlarına göre proteinler jel kuyucuklarına eşit miktarlarda (40µg/ml) yüklendi. Proteinleri ağırlıklarına göre birbirinden ayırma işlemi, içeriği 6,06gr Tris, 28,83gr glycine ve 2gr SDS olan solüsyon içinde elektroforez cihazı (Hoefler, USA) vasıtasıyla üretilen elektrik alan ile yapıldı. Ağırlıklarına göre birbirinden ayrılan proteinler transfer sistemi (Trans-Blot Turbo BioRad) kullanılarak 25 V 1,2 mA 12 dakika poliviniliden diflorür (PVDF) membrana transfer edildi. Membran bloklama işlemi için %3 olarak hazırlanan süt tozu solüsyonuyla 2 saat boyunca inkübe edildi. Bu sürenin sonunda membran tampon solüsyonu ile 5 dk inkübe edilerek süt tozu uzaklaştırılmıştır. Primer antikor oranları Stim1 1:1000 (BioLegend 621701), Stim2 1:500 (Thermo Fisher, PA5-17146), Orai1 1:250 (Thermo Fisher, MA5-15776), Orai2 1:500 (Thermo Fisher, PA5-20369), Orai3 1:250 (Thermo Fisher, MA5-15778) olacak şekilde yine %3'lük bovine albümin serum (BSA) solüsyonu içerisine alınarak tüm gece boyunca membranlar yıkanmıştır. Ertesi gün primer antikorları uzaklaştırma işlemi için tampon solüsyonuyla membranlar 20 dk süresince inkübe edilmiştir. Daha sonra %3'lük BSA solüsyonu içinde goat anti-mouse IgG (SantaCruz, sc2031) ya da goat anti-rabbit IgG (SantaCruz, sc2004) primer antikorlarıyla eşleşebilecek Horseradish peroksidaz sekonder antikor kullanıldı. Membran, sekonder antikoruyla 1saat süreyle yıkandı. Ardından membranlar 20 dk süre ile tampon solüsyonu ile inkübe edildi. Bantlar, üretici firma talimatlarına göre, ECL saptama reaktifi kullanılarak tespit edildi. Son olarak membranlar filme alınarak grupların protein ekspresyon seviyeleri hedef protein ile eşlenen GAPDH veya β-

Tübülin oranlanmasıyla belirlendi. Elde edilen tüm sonuçların analiz işlemlerinde Image J programı kullanıldı.

### **3.8 İstatiksel Analiz**

Tüm deney sonuçları GraphPad Prism 5.0 programı kullanılarak ortalama  $\pm$  SEM olarak verilmiştir. Tüm parametreler ANOVA testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. ANOVA testi sonrasında gruplar arası farkı belirlemek amacıyla Dunnett testi kullanılmıştır. İstatiksel anlamlılık test değeri olarak 0.05 değeri seçilmiştir.

### **3.9 Kullanılan Kimyasallar**

KCl, NaCl, 2-APB, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, Glikoz, CsCl, MgCl<sub>2</sub>, MgATP, EGTA, HEPES, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Caffeine ve SKF96365 Sigma (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany)'dan satın alınmıştır. Thapsigargin Thermo Fisher firmasından satın alınmıştır. Collagenase A Roche firmasından (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) satın alınmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hayvanların Genel Durumları

Deneyle yaklaşık olarak 12-15 haftalık ve ağırlıkları 250-350 g olan yetişkin erkek sıçanlar kullanılmıştır. Tablo 4.1’de görüldüğü gibi vücut ağırlık değerleri ve kan glikoz düzeyleri tüm deney gruplarındaki sıçanlar için başlangıçta aynı seviyede seyrederken diyabet gruplarında ilk hafta sonunda kilo alımlarında bir duraksama veya azalma olduğu görülmüştür. Kan glikoz değerleri kıyaslandığında ise STZ enjeksiyonu sonrası ilk hafta ölçümü için DM ve DM+Los grubunda kontrol gruplarına göre yaklaşık olarak 4 katlık bir artış görülmüştür. 4 hafta sonundaki değerleri kıyaslandığında ise DM ve DM+Los gruplarındaki hayvanlarda K değerlerine göre anlamlı derecede kilo kaybı görülürken, kan glikoz değeri yönünden K gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış görülmüştür.

K ve K+Los gruplarındaki sıçanlarda ise 4 hafta boyunca kan şekerleri değerleri sabit kalırken vücut ağırlıklarında düzenli kilo artışı görülmüştür.

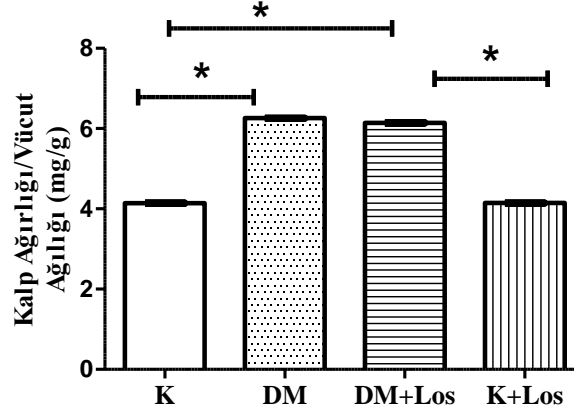
**Tablo 4.1.** Deney gruplarının genel parametreleri

	Vücut Ağırlığı (g)		Kan Şekeri (mg/dl)	
	Başlangıç	Son	Başlangıç	Son
<b>K (n=11)</b>	360,3±2,7	386,7±2,1	98,5±2,4	112,7±4,2
<b>DM (n=14)</b>	359,5±4,3	306,8±3,32*	102,2±7,5	587,4±7,9*
<b>DM + Los (n=10)</b>	330,9±2,4	301,3±4,7*	95,4±6,3	595,9±9,8*
<b>K + Los (n=8)</b>	334,3±1,8	392,38±3,6	110,4±4,7	115,2±3,8

Deney başlangıç ve sonu hayvanların ölçülen ağırlık (g) ve kan şekeri düzeyleri (mg/dl) olarak verilmiştir. Değerler ortalama±SEM olarak verilmiştir. n= hayvan sayısı; \*p<0,05. (K: Kontrol, DM: Diabetes Mellitus, DM+Los: Diabetes Mellitus + Losartan, K+Los: Kontrol + Losartan).

Ayrıca deney hayvanlarına losartan uygulanmasının kalp ağırlığı ve kalp ağırlığı/vücut ağırlığı parametrelerine etkileri de araştırılmıştır. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi losartan uygulanmasının kalbin morfolojik özelliklerine bir etkisinin olmadığı anlaşılmaktadır. Diyabetin neden olduğu aşırı kilo kaybı nedeniyle,

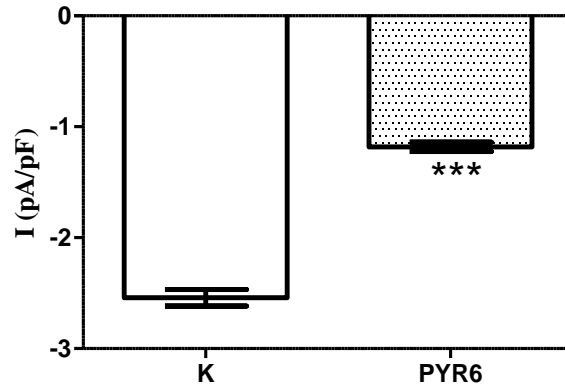
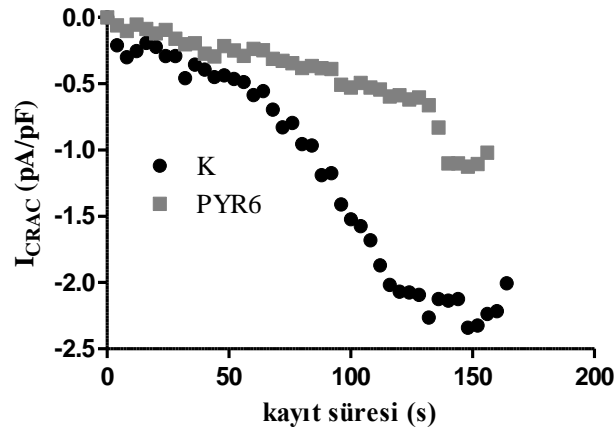
diyabetik hayvanların Kalp Ağırlığı/Vücut Ağırlığı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** Deney hayvanlarının kalp ağırlığı/vücut ağırlığı değişimleri. (K: Kontrol (n=8), DM: Diabetes Mellitus (n=14), DM+Los: Diabetes Mellitus + Losartan (n=10), K+Los: Kontrol + Losartan n=8). \*:  $p < 0,05$

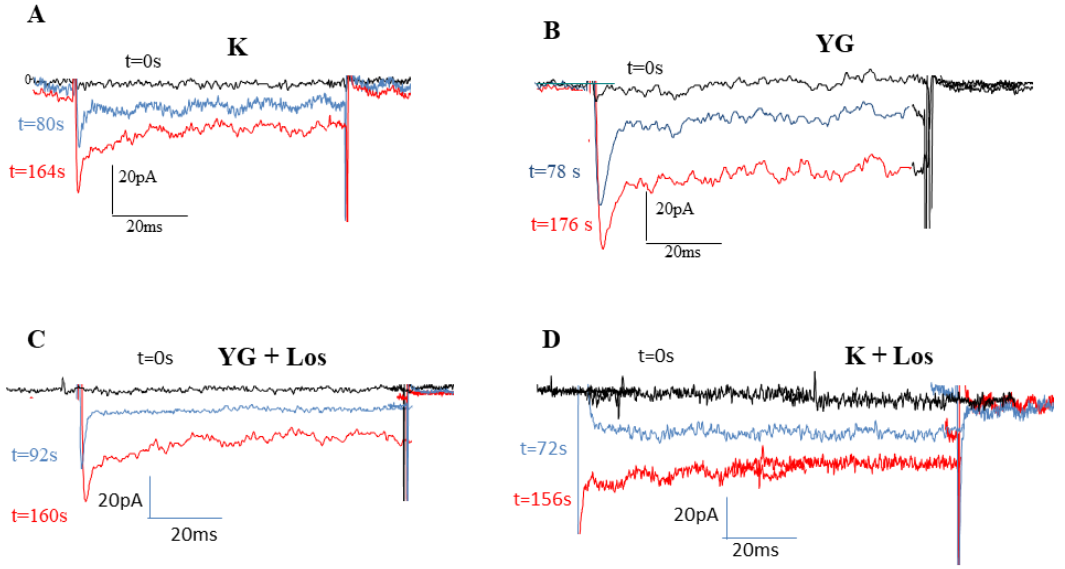
#### 4.2 RBL-1 hücrelerinde SOC Akımları

1981'deki keşfedilmelerinden bu yana, RBL-1 hücreleri, mast hücresi (MH) modeli olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Kültüre ortamda kolaylıkla yetiştirilme yetenekleri ve genetik olarak manipüle edilebilmeleri, özellikle genetik taramaya dayanan moleküler çalışmalar için birincil MH'lere göre avantajlar sağlamıştır. Tüm bu özelliklerinin yanı sıra RBL hücreleri SOC kanalları yönünden oldukça zengin bir yapıya sahiptir ve bu yüzden kalp hücrelerinde SOC akımları çalışılmadan önce  $I_{CRAC}$  ölçümleri için önce RBL-1 hücrelerinin kullanılması uygun görülmüştür. Literatür bilgileri incelendiğinde kardiyomiyositlerde bu kanalların varlığının halen tartışma konusu olduğu görülecektir. Bu anlamda RBL-1 hücrelerinde ölçülecek  $I_{CRAC}$  akımları kardiyomiyositlerde ölçülemese bile bu durumun laboratuvar koşullarından olmadığı bir göstergesi olacaktır. Şekil 4.2'de RBL-1 hücrelerinden elde edilen  $I_{CRAC}$  akımlarının zamana göre değişim grafiği görülmektedir. SOC kanal blokörü olarak sıklıkla kullanılan PYR6 inhibitörü elde edilen akımların bu kanallara ait olduğunu göstermek için kullanılmıştır. Elde edilen akım yoğunlukları kıyaslandığında (K: -2,33 pA/pF, PYR6: -1,12 pA/pF,  $p < 0,001$ ), PYR6 uygulamasının akım değerlerini ~%50 derecesinde inhibe ettiği görülmüştür.



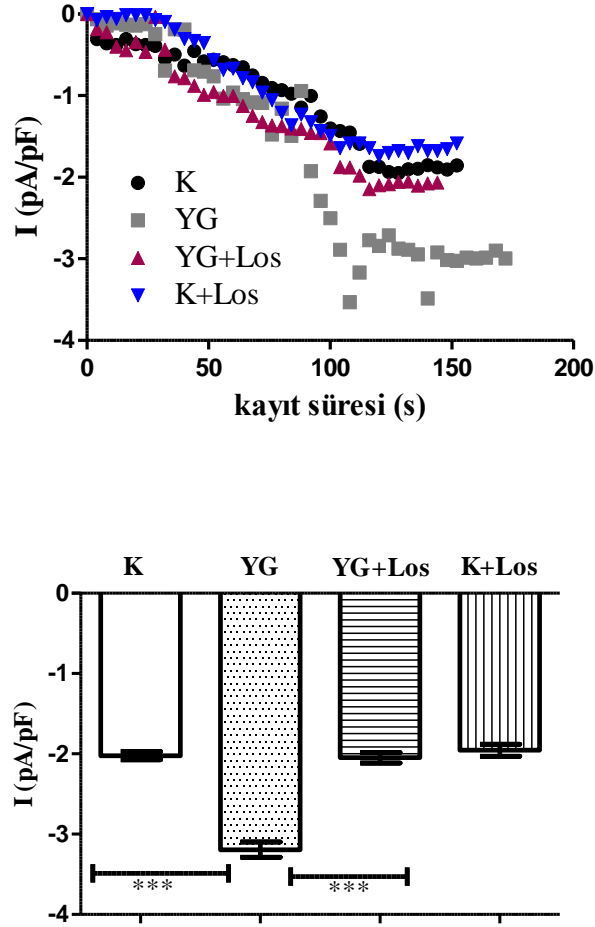
**Şekil 4.2.** RBL-1 hücrelerinden elde edilen  $I_{CRAC}$  akımları. RBL-1 hücreleri 20 dakika boyunca PYR6 (2 $\mu$ M) ile ön işleme tabi tutuldu. Bar grafiği (ortalama  $\pm$  S.E.M), -80 mV değerindeki akım yoğunluklarını göstermektedir. Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırma student t-test uygulanarak gerçekleştirilmiştir (\*\*\*) $p < 0,001$ ).

RBL-1 hücrelerde  $I_{CRAC}$  akımları elde edildikten sonra kardiyomiyositlerde yapılması planlanan deney çalışmaları RBL-1 hücreleri üzerinde de çalışılmıştır. Hücre kültürlerinde diyabetik durumu sağlamak için hücreler yüksek glikoz (50 mM) değerine sahip DMEM solüsyonu kullanılarak çoğaltılmaktadır. Bu yüksek glikoz ortamında kültüre hücreler 72 saat bekletilip daha sonra deneye alınmıştır. RBL-1 hücreleri 0 mV dinlenme değerinde tutulup -80 mV potansiyel değerine step protokolü uygulanarak  $I_{CRAC}$  akımları ölçülmüştür. Bu şekilde tüm gruplar için elde edilen örnek akım kayıtları Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Şekilden de anlaşılacağı gibi depo boşalmasına bağlı olarak geçen süre ile birlikte maksimum bir değere ulaşana kadar ölçülen  $I_{CRAC}$  akımları da artmaktadır.



**Şekil 4.3.** RBL-1 hücrelerine ait I<sub>CRAC</sub> akımlarını gösteren örnek kayıtlar. **A)** Kontrol, **B)** Yüksek Glikoz, **C)** Yüksek Glikoz + Losartan ve **D)** Kontrol + Losartan

Şekil 4.3'te gösterilen akım kayıtları kullanılarak zamana bağlı gelişen I<sub>CRAC</sub> akımlarının -80 mV'daki değerleri ilgili hücrenin sıçasına oranlanarak akım yoğunluğunun zaman göre değişim grafikleri olarak Şekil 4.4'deki gibi elde edilmiştir.



**Şekil 4.4.** RBL-1 hücreleri  $I_{CRAC}$  akımlarının zamana göre değişim grafikleri. **A)** Tüm gruplar için elde edilen akım kayıtlarının  $-80$  mV değerlerinin zamana göre değişim grafikleri. **B)** Bar grafiği (ortalama  $\pm$ S.E.M) her bir durum için elde edilen  $-80$  mV değerindeki akım yoğunluklarının tepe değerlerini göstermektedir. Tüm durumlar arasındaki istatistiksel karşılaştırma one way ANOVA (Dunnett test) ile hesaplanmıştır (\*\*\*,  $P < 0,01$ ). (K; Kontrol, YG;Yüksek Glikoz + Losartan, YG+Los; Yüksek Glikoz + Losartan, K+Los; Kontrol + Losartan). Her bir değer (ortalama  $\pm$  SEM) 3–5 ayrı deneylerden ve her bir grup için toplam 10-15 hücreden elde edilmiştir.

Şekil 4.4’de görüldüğü gibi yüksek glikoz (50 mM) ortamında çoğaltılan RBL-1 hücrelerinde ölçülen  $I_{CRAC}$  akım yoğunluklarının kontrol değerlerine göre anlamlı derecede arttığı anlaşılmaktadır (K:  $-2,024$  pA/pF, YG:  $-3,194$  pA/pF,  $p < 0,001$ ). YG grubunda görülen bu artışın YG + Los uygulanan grupta kontrol değerine döndüğü görülmektedir. Ayrıca K ve K + Los grupları arasında  $I_{CRAC}$  akımları yönünden anlamlı herhangi bir farklılık görülmemiştir.

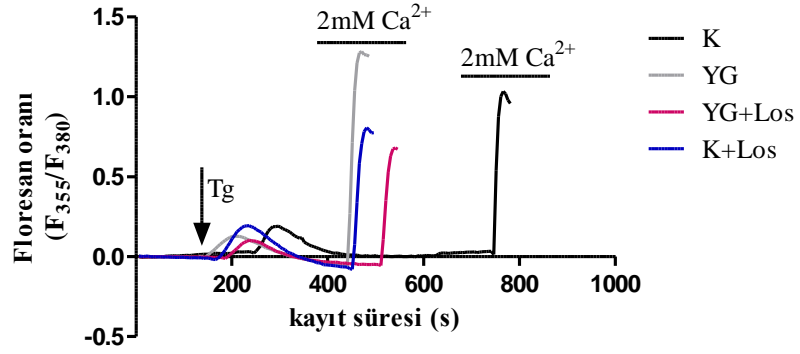
### 4.3. RBL-1 ve H9C2 Hücrelerinden Elde edilen $Ca^{2+}$ Sinyal Bulguları

Depo bağımlı  $Ca^{2+}$  giriş mekanizmalarının en çok çalışıldığı hücre türü olan RBL-1 hücre modeli diyabetik etkinin bu kanallardaki etkisinin araştırılması için

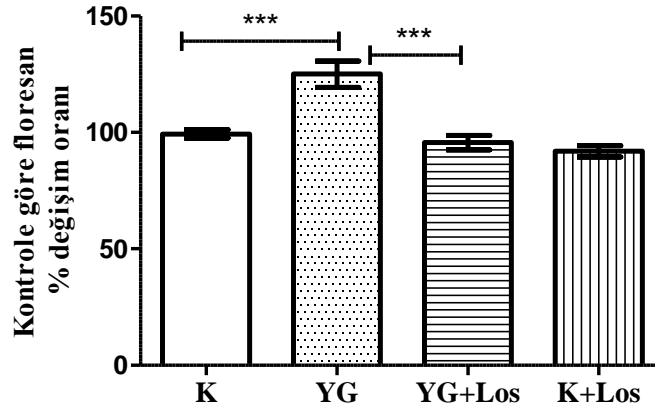
kullanılmıştır. Ayrıca literatür bilgileri göz önüne alındığında bazı çalışmalarda SOCE mekanizmasının neonatal dönemde görüldüğü ve ilerleyen dönemde bu kanalların etkinliğinin ortadan kalktığını gösteren bir çok çalışma olması nedeniyle H9C2 embriyonik kardiyomiyositler de  $Ca^{2+}$  sinyal ölçümlerinde deneylere dahil edilmiştir. H9C2 hücre hattı yetişkin kardiyomiyositlerle fonksiyonel yönden oldukça benzer özellikler göstermektedir. Bu anlamda embriyonik ve yetişkin kardiyak hücrelerde SOCE akımlarının karşılaştırılması önemli bilgiler sağlayacaktır.  $Ca^{2+}$  sinyal ölçümleri için Fura-2 tabanlı  $Ca^{2+}$  görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir. SERCA inhibitörü olarak kullanılan Tg pasif olarak ER/SR depolarının boşalmasına neden olduğu için, Tg varlığında 0  $Ca^{2+}$  ortamında bir süre inkübe edilen hücreler daha sonra 2 mM  $Ca^{2+}$  ortamına alınarak SOCE ölçümleri gerçekleştirilmektedir. RBL-1 ve H9C2 hücrelerinde diyabetik koşulun sağlanabilmesi için hücreler 72-saat süre ile yüksek glikoz ortamında bırakılmıştır. Bu sürecin sonunda her bir grup için ilgili deneyler gerçekleştirilmiştir.



A

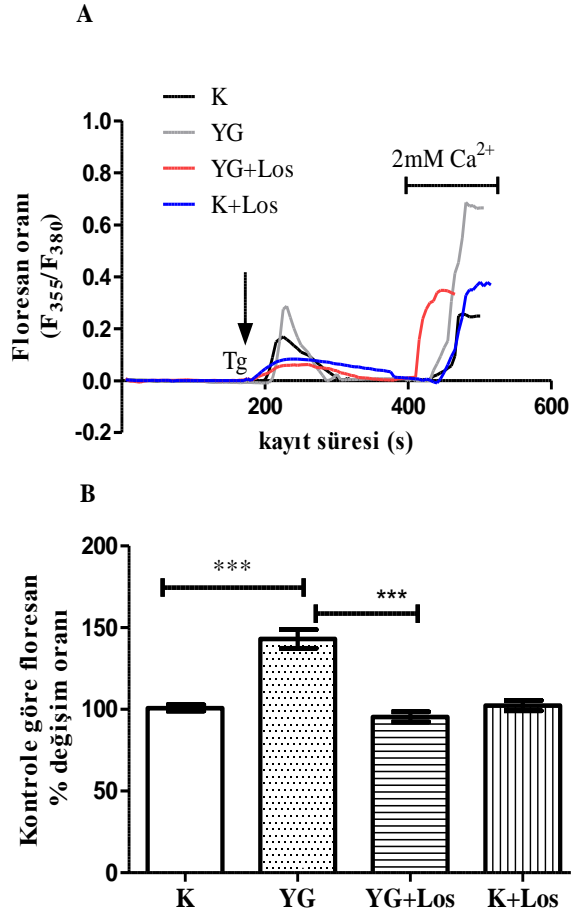


B



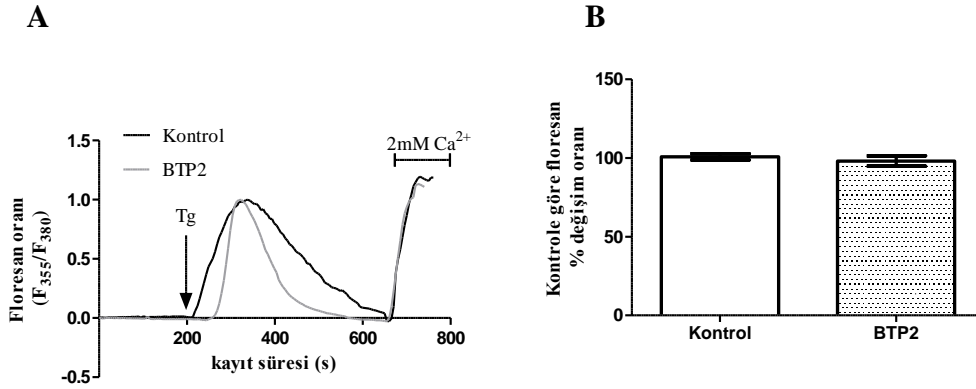
**Şekil 4.5.** A) RBL-1 hücrelerine 2  $\mu$ M (Tg) eklenerek tetiklenen Ca<sup>2+</sup> sinyallerini (Fura-2 floresan oranı) temsil eden her bir grup için örnek kayıtlar. B) Tg ile tetiklenen SOCE tepe değerlerini gösteren histogram grafiği. Tüm durumlar arasındaki istatistiksel karşılaştırma one way ANOVA (Dunnett test) ile hesaplanmıştır (\*\*; P<0,05, \*\*\*; p<0,001). (K; Kontrol, YG; Yüksek glikoz, YG + Los; Yüksek Glikoz + Losartan ve K + Los ise Kontrol + Losartan). Her bir değer (ortalama  $\pm$  SEM) 3–5 ayrı deneylerden ve her bir grup için toplam 60-80 hücreden elde edilmiştir.

Şekil 4.5’de ise H9C2 hücrelerine 2  $\mu$ M Tg ile tetiklenen Ca<sup>2+</sup> sinyallerini (Fura-2 floresan oranı ile gösterilen) temsil eden kayıtlar gösterilmiştir.



**Şekil 4.6.** A) H9C2 hücrelerine  $2\mu\text{M}$  Tg eklenerek tetiklenen  $\text{Ca}^{2+}$  sinyallerini (Fura-2 floresan oranı) temsil eden her bir grup için örnek kayıtlar. B) SOC kanallardan kaynaklı akımların tepe değerlerini gösteren histogram grafiği. Tüm durumlar arasındaki istatistiksel karşılaştırma one way ANOVA (Dunnett test) ile hesaplanmıştır (\*\*\*,  $p < 0,001$ ). (K; Kontrol, YG; Yüksek glikoz, YG + Los; Yüksek Glikoz + Losartan ve K + Los ise Kontrol + Losartan). Her bir değer (ortalama  $\pm$  SEM) 3–5 ayrı deneylerden ve her bir grup için toplam 10-15 hücreden elde edilmiştir.

Şekil 4.5 ve Şekil 4.6 grafikleri incelendiğinde hem RBL hem de H9C2 kültüre hücrelerinin yüksek glikoz ortamında SOCE tepe değerlerinin kontrole göre anlamlı derece arttığı görülmektedir. H9C2 hücrelerindeki bu artışın losartan inkübasyonu sonucu YG + Los grubunda kontrol değerine yaklaştığı görülmektedir. K ve K + Los grupları arasında ise anlamlı bir fark görülmemektedir. RBL hücrelerinde ise H9C2 embriyonik kardiyomyosit hücre hattında olduğu gibi losartan ile inkübe edilmesi YG + Los grubu SOCE tepe değerlerinin kontrol değerinin döndürdüğü görülmektedir. K ve K + Los grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. H9C2 embriyonik kardiyomyositlerde pozitif kontrol deneyleri BTP2 uygulanarak gerçekleştirilmiştir. H9C2 hücreler deneye alınmadan önce yaklaşık 20 dk BTP2 ( $10\mu\text{M}$ ) ile inkübe edilmiştir.



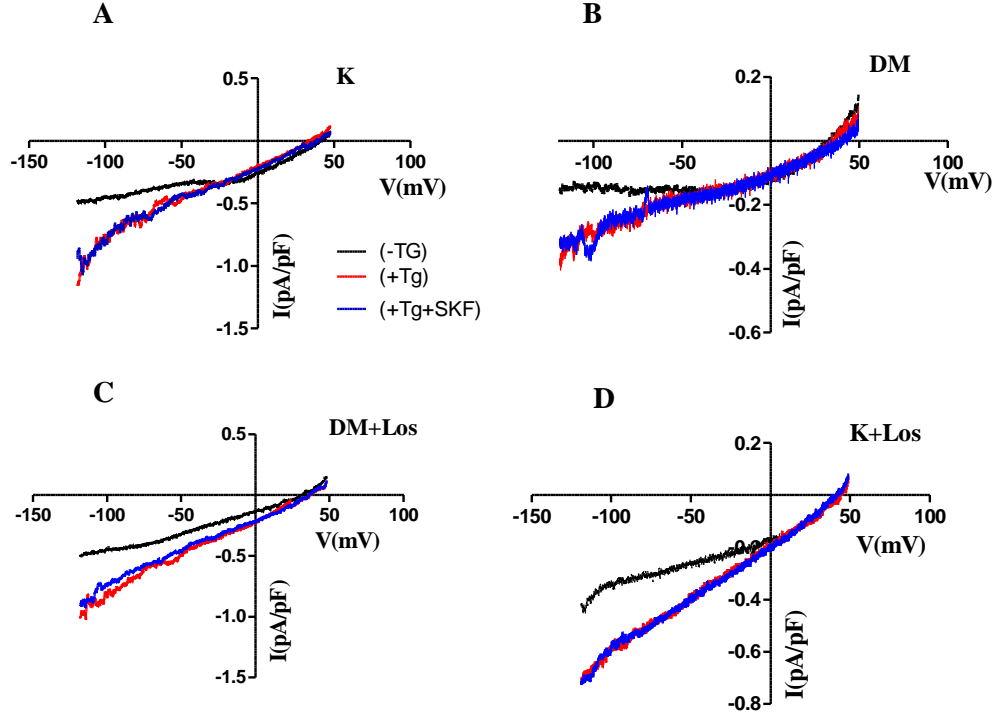
**Şekil 4.7. A)** H9C2 hücrelerine 2  $\mu$ M Tg eklenerek tetiklenen Ca<sup>2+</sup> sinyallerini (Fura-2 floresan oranı) temsil eden her bir grup için örnek kayıtlar. **B)** Kontrol ve BTP2 (10  $\mu$ M) uygulanan hücrelerde SOC kanallardan kaynaklı akımların tepe değerlerini gösteren histogram grafiği. Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırma student t-test ile hesaplanmıştır. Her bir değer (ortalama  $\pm$  SEM) 3–5 ayrı deneylerden ve her bir grup için toplam 10-15 hücreden elde edilmiştir.

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi SOCE blokörü olarak sıklıkla kullanılan BTP2’nin H9C2 embriyonik kardiyomiyositlerde SOCE aktivitesi üzerine bir etkisinin olmadığı anlaşılmaktadır.

#### 4.4. Deneysel Diyabetin Kardiyak Hücrelerde Depo Bağımlı Ca<sup>2+</sup> Kanal (SOC) Akımlarına Etkisi

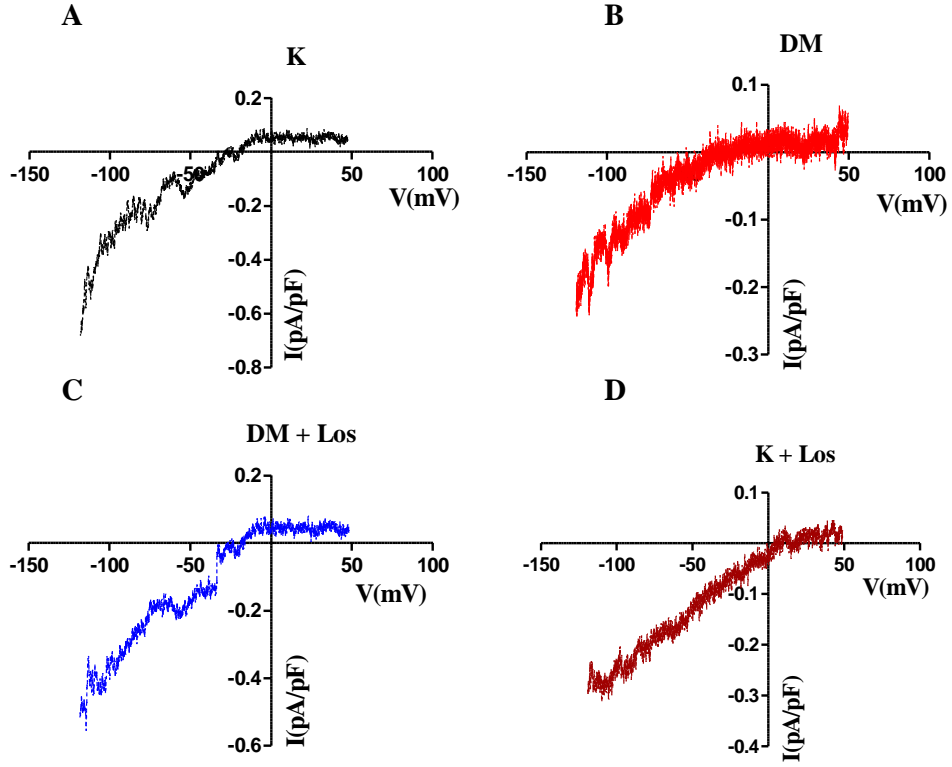
Kardiyak uyarılma-kasılma çiftlenimi, sıkı bir şekilde düzenlenmiş Ca<sup>2+</sup> akıları vasıtasıyla gerçekleşir. Sitozole Ca<sup>2+</sup> girişi, VDCC aracılığıyla ve SR’den RyR’den salınımı yoluyla gerçekleşir. Bu süreci takiben milisaniyeler içerisinde sitozoldeki Ca<sup>2+</sup>, SR üzerinde bulunan SERCA tarafından geri alınması ve PM’da bulunan Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> değiş-tokuşçu (NCX) aktivitesi ile ortamdan hızlı bir şekilde uzaklaştırılır. Bu korunaklı sisteme SOC kanallarının katkısı halen tartışmalı olsa da son zamanlarda yapılan çalışmalar bu kanalların hücre içi Ca<sup>2+</sup> homeostazının sağlanmasında oldukça önemli bir yer teşkil ettiği göstermektedir. Özellikle bu kanalların SR Ca<sup>2+</sup> içeriğine bağlı olarak çalışıyor olması ve SR Ca<sup>2+</sup> doluluğunun kalp kasının daha etkin kasılmasında rol aldığı göz önüne alındığında bu kanalların hem fizyolojik hem de patofizyolojik durumlardaki etkinliğinin detaylı bir şekilde araştırılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, SOC kanallarının kardiyomiyositlerde nasıl bir rol aldığı ve diyabetik kardiyomiyopati durumunda nasıl bir değişim gösterdiğini değerlendirmek için deney sürecinden belirlenen her bir grup için I<sub>CRAC</sub> akım ölçümleri gerçekleştirilmiştir. SOC kanal akımları voltaj

kenetleme tekniği kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümlerden elde edilen akım değerleri hücre sıçasına oranlanarak akım yoğunluğunun potansiyele göre değişim grafiği (I-V) olarak Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.8.** Kardiyomiyositlerden elde edilen  $I_{CRAC}$  akımlarının potansiyele göre değişim grafikleri. **A)** Kontrol, **B)** Diabetes Mellitus, **C)** Diabetes Mellitus + Losartan ve **D)** Kontrol + Losartan grupları için elde edilen akım-voltaj grafikleri. Her bir grup için grafikler Thapsigargin öncesi (-Tg), Tg uygulaması sonrası (+Tg) ve SOCE inhibitörü olarak SKF-96365 uygulaması sonrası (+Tg+SKF) olacak şekilde gösterilmiştir.

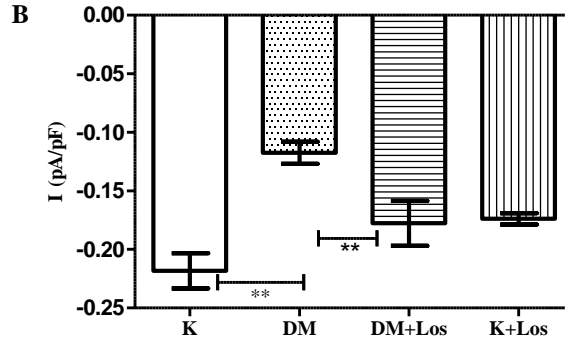
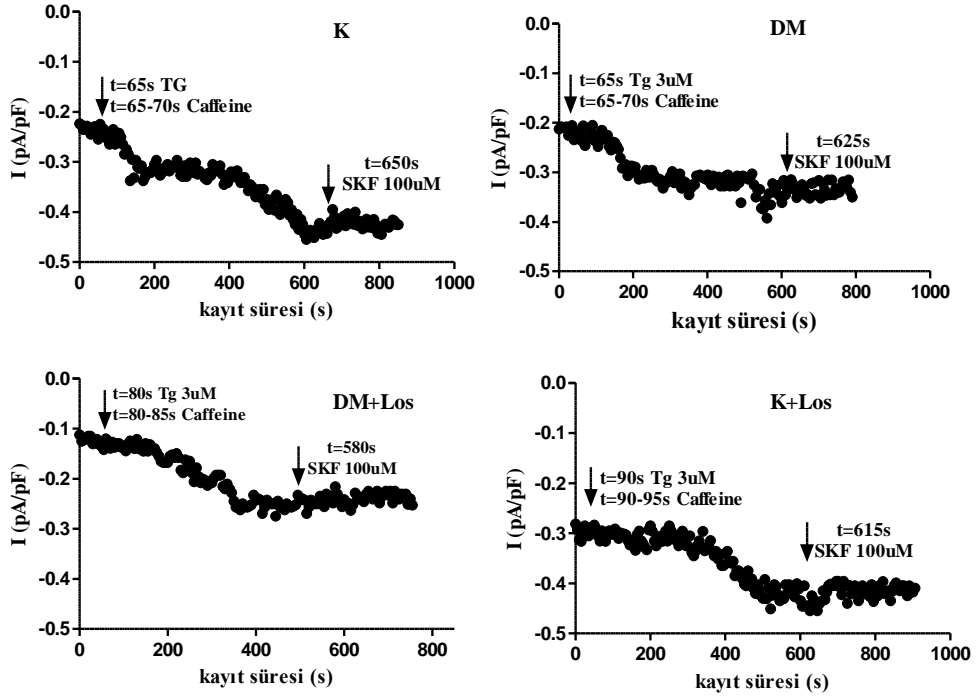
Şekil 4.8’de Tg uygulaması öncesi ve sonrası ve ayrıca SKF96365 inhibitörünün uygulanması neticesiyle elde edilen akım-voltaj grafikleri görülmektedir. Bu kayıtlarda SOC kanallardan kaynaklanan akımları göstermek için Tg uygulanmadan önceki akımlar, Tg uygulandıktan sonra elde edilen akımlardan çıkarılmıştır. Şekil 4.9’da bu işlem neticesinde elde edilen ve sadece SOC kanallarına ait olan akımlar tüm gruplar için ayrı ayrı gösterilmiştir.



**Şekil 4.9.** Çıkarılmış  $I_{CRAC}$  akımlarına ait I-V grafikleri. Deneyde kullanılan tüm gruplar için (-Tg) uygulanmadan önce elde edilen akımlar (+Tg) sonrası akımlardan çıkarılarak elde edilmiş  $I_{CRAC}$  akımlarının akım-voltaj (I-V) grafikleri. (K: Kontrol, DM: Diabetes Mellitusi DM+Los: Diabetes Mellitus + Losartan, K+Los: Kontrol + Losartan).

Bilindiği üzere  $I_{CRAC}$  akımları hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarının boşalmasına bağlı olarak aktif olmakta ve hücre membranında bulunan Orai kanallarının üzerinden hücre içerisine  $Ca^{2+}$  alınması ile sonuçlanmaktadır. Bu süreç SR  $Ca^{2+}$  depolarının üzerinde bulunan Stim proteinlerinin SR içeriğinin azalması sonucu kümelenmeler oluşturarak SR-hücre membranı ile yakınlaştığı bölgelerine hareket etmekte ve Orai kanallarını aktive etmektedir. Bu süreç dakikalar mertebesinde gerçekleşen bir süreç olmasından dolayı  $I_{CRAC}$  akımlarının zamana göre değişimlerinin belirlenmesi bu akımların karakteristiklerini açıklamada önemli bir yer tutmaktadır. Bu nedenle tüm gruplardan elde edilen akım kayıtlarında SOC kanallarına ait olan akımların zamana göre değişim grafikleri Şekil 4.10'de gösterilmiştir.

A



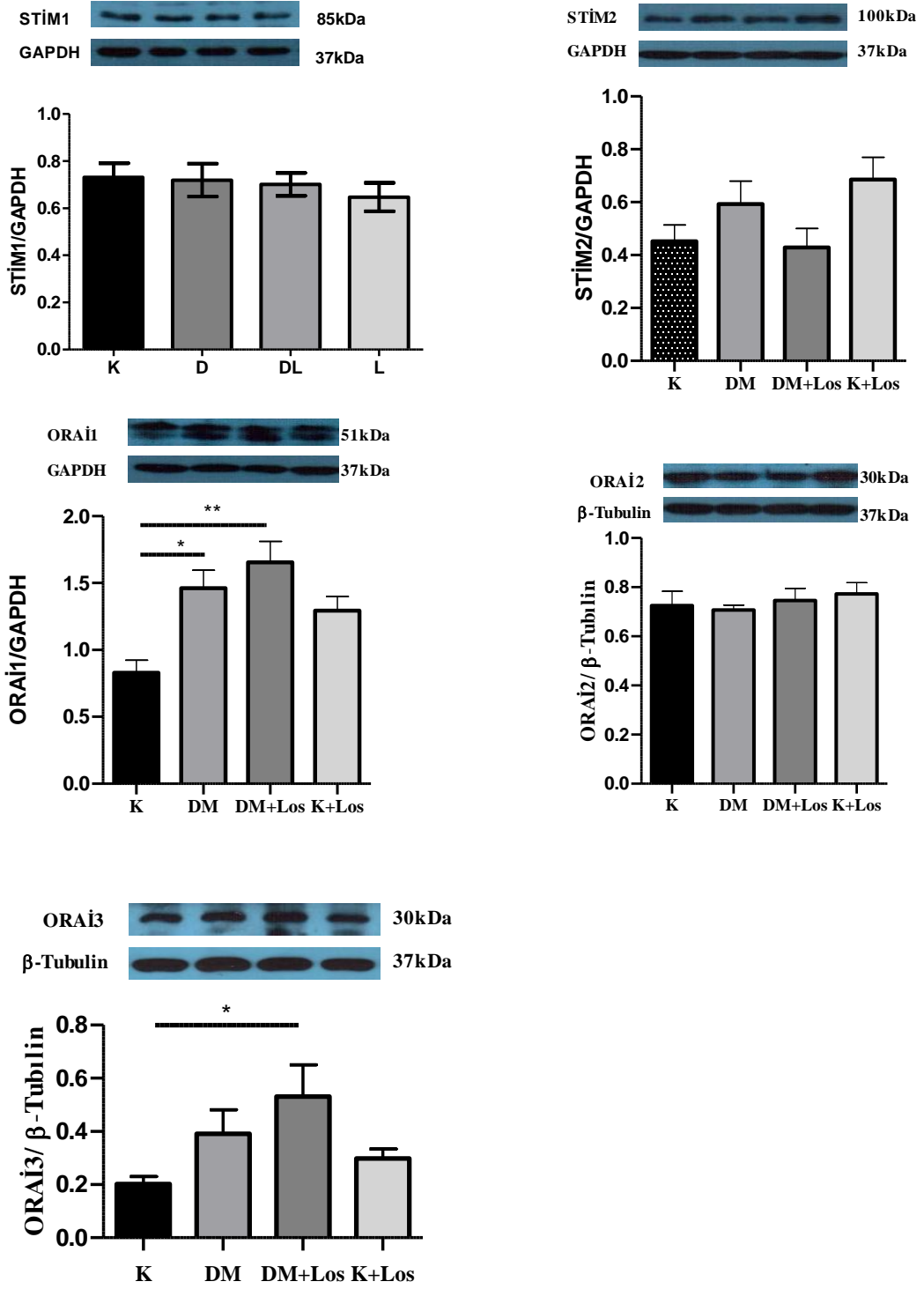
**Şekil 4.10.** Tüm gruplar için sıçan sol ventrikül hücrelerinden elde edilen  $I_{CRAC}$  akımlarının zamana göre değişim grafikleri. A) -80mV dinlenim potansiyelinde olan hücrelere 50mV ile -100mV arasında 1s süreli ramp protokolü uygulanarak elde edilen kayıtlardan -80mV'daki  $I_{CRAC}$  akımlarının zamana göre değişim grafiği. B) Bar grafiği (ortalama  $\pm$ S.E.M) tüm grupların akım yoğunluklarının tepe değerlerini göstermektedir. Tüm durumlar arasındaki istatistiksel karşılaştırma one way ANOVA (Dunnett test) ile hesaplanmıştır (\*\*;  $P < 0,05$ ). (K: Kontrol, DM: Diabetes Mellitusi DM+Los: Diabetes Mellitus + Losartan, K+Los: Kontrol + Losartan). Her bir değer 5-10 ayrı deneylerden ve her bir grup için toplam 10-15 hücreden elde edilmiştir.

Gruplardan elde edilen akım yoğunluklarının zamana göre değişimleri incelendiğinde, DM grubunda akım yoğunluğunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı (-80 mV'ta K: -0,21 pA/pF; DM: -0,11 pA/pF,  $p < 0,001$ ), bu azalma DM + Los grubunda ise kontrol değerlerine yaklaştığı gözlemlenmiştir (-80mV mV'ta DM: 0,11 pA/pF; DM + Los: -0,177 pA/pF,  $p < 0,001$ ). Ayrıca, K+Los grubu ile kontrol grubu arasında akım yoğunluğu bakımından anlamlı bir fark olmadığı

görülmektedir (-80 mV'ta K: -0,21 pA/pF; K+Los: -0,18 pA/pF) (Şekil 4.7B). Ayrıca Şekil 4.10'daki grafiklerden görüldüğü gibi SOC kanal blokörü olarak kullanılan SKF96365'in Tg uygulaması sonrası gelişen akımlar üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı anlaşılmaktadır.

#### **4.5. SOCE Proteinlerinin Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi**

SOC kanalları bilindiği gibi hücre içindeki Ca<sup>2+</sup> depolarının boşalmasına bağlı olarak aktive olmakta ve bu süreçte Stim ve Orai proteinleri görev almaktadır. Stim proteinleri Stim1 ve Stim2 olmak üzere iki tane ve Orai kanalları Orai1-3 olmak üzere 3 tane üyesi vardır. Literatür bilgileri incelendiğinde bu proteinlerin kalpteki ekspresyonları halen büyük bir tartışma konusudur. Bu anlamda bu proteinlerin kalpteki ekspresyon durumlarını belirlemek ve patofizyolojik durumlardaki değişikliklerini anlayabilmek için western blot yöntemi ile Stim1-2 ve Orai1-3 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri çalışılmıştır.



**Şekil 4.11.** Tüm deney grupları için SOC kanal proteinlerinin western blot görüntü örnekleri ve protein ekspresyon analizleri. A) Stim1 (85 kDa), B) Stim2 (100 kDa), C) Orai1 (51 kDa), D) Orai2 (30 kDa) ve E) Orai3 (70 kDa) protein ekspresyon miktarları. Her protein ekspresyonu GAPDH veya β-Tubulin ile normalize edilmiştir. Değerler ortalama ±S.E.M olarak verildi. Tüm durumlar arasındaki istatistiksel karşılaştırma one way ANOVA (Dunnett test) ile hesaplanmıştır (\*;  $p < 0,05$ , \*\*; $p < 0,01$ ). (K; Kontrol, DM; Diabetes Mellitus, DM + Los; Diabetes Mellitus + Losartan ve K + Los: Kontrol + Losartan).Tüm gruplar için n=4 veya n=8.



Şekil 4.11’da görüldüğü gibi Stim1, Stim2 ve Orai2 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde tüm gruplar arasında anlamlı bir fark görünmemektedir. Diğer yandan deney grupları arası Orai1 ekspresyon dağılımlarına bakıldığında diyabet gruplarında bu proteinlerin ekspresyonlarının anlamlı derecede arttığı görülmektedir (K:0,82, DM:1,46,  $p<0,05$ ). DM+Los grubunda ise bu artışın daha da belirgin olduğu anlaşılmaktadır (DM: 0,82, DM+Los: 1,46,  $p<0,05$ ). Ayrıca K ve K+Los grupları arasında Orai1 protein ekspresyonları açısından anlamlı bir fark görünmemektedir. Son olarak tüm gruplar içinde Orai3 protein ekspresyon seviyeleri incelendiğinde DM grubunda Orai3 protein ekspresyon seviyelerinin anlamlı ölçüde arttığı (K: 0,202, DM: 0,391,  $p<0,05$ ), DM grubunda ise bu artışın değişmediği görülmüştür (DM: 0,391, DM+Los: 0,51). K ve K+Los grupları incelendiğinde ise Orai3 protein ekspresyon seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (K: 0,202, K+Los: 0,290).

## 5. TARTIŞMA

Ca<sup>2+</sup> salınımı ile aktive olan Ca<sup>2+</sup> girişi (CRAC) (Hoth ve Penner, 1992, 1993) veya kapasitif kalsiyum girişi (CCE) (Putney ve McKay, 1999) olarak bilinen SOCE, hem uyarılabilir hem de uyarılmayan hücrelerde önemli bir Ca<sup>2+</sup> giriş mekanizmasıdır. Bu Ca<sup>2+</sup> girişine, ER/SR Ca<sup>2+</sup> depolarının boşalması ile aktive olan depo bağımlı Ca<sup>2+</sup> kanalı (SOC) aracılık eder (Parekh ve Putney, 2005). Bu nedenle, ya GQCR ya da reseptör tirozin kinazları aktive edebilen dolaşımdaki ya da lokal olarak üretilen hormonlar, PLC/IP3 yolağının aktivasyonu ile SOC kanalları açılmasını tetikleyebilir (Jardin ve ark., 2011).

SOCE yaklaşık olarak 30 yıl önce keşfedilmiş olmasına rağmen, moleküler oyuncuları yakın zamana kadar kesin olarak tanımlanmamıştı. Yüksek verimli RNAi taramasıyla, iki protein ailesi, STIM ve Orai, SOCE'nin gerekli bileşenleri olarak tanımlanmıştır (Liou ve ark., 2005; Roos ve ark., 2005; Feske ve ark., 2006; Vig ve ark., 2006). ER/SR Ca<sup>2+</sup> miktarının azalmasına bağlı olarak STIM1'ler kümelenmeler oluşturarak ER-plazma membran yakınlığı bölgelerine hareket ederler ve fiziksel olarak birleştiği Orai1 kanallarını aktive ederek sitozole Ca<sup>2+</sup> girişine neden olurlar (Deng ve ark., 2009; Wang ve ark., 2010). STIM1 ve Orai1'e ek olarak, STIM2, Orai2 ve Orai3 de farklı fonksiyonel özelliklere sahip olmakla birlikte SOC oluşturabilir veya düzenleyebilir (Soboloff ve ark., 2006b; DeHaven ve ark., 2007; Lis ve ark., 2007; Motiani ve ark., 2010). Orai/STIM ailesi tarafından oluşturulan SOCE yolu, farklı sinyal ve düzenleyici özelliklere sahip SOC üreten Orai1 (Orai1 $\alpha$  ve Orai1 $\beta$ ) ve STIM1 (STIM1L)'in yeni varyantlarının yakın zamanda tanımlanmasıyla daha karmaşık hale gelmiştir (Darbellay ve ark., 2011; Fukushima ve ark., 2012; Luo ve ark., 2012; Desai ve ark., 2015). Ayrıca, Orai1 ve STIM1'in yanı sıra SOC'nin moleküler bileşenleri olarak öngörülen kanonik geçici reseptör potansiyel (TRPC) proteinlerinin birkaç izoformu da STIM1 ve/veya Orai1 ile etkileşime girerek SOCE'ye katkıda bulunabilmektedir (Worley ve ark., 2007; Yuan ve ark., 2007; Kim, Hong, ve ark., 2009; Kim, Zeng, ve ark., 2009; Liao ve ark., 2009; Ong ve ark., 2013). Dolayısıyla, SOCE elemanlarının ve bunların etkileşim mekanizmasının hücre türüne bağlı olarak değiştiği düşünülmektedir. Ayrıca Stim1L/Orai1 kaynaklı akımların sadece myoblast hücrelerde gösterilmesiyle birlikte SOC akımlarının hücre türüne göre değişiklik gösterebileceği düşünülmektedir.

RBL-1 hücreleri SOC kanallarının ekspresyonlarını yönünden oldukça zengin olmaları, kültüre ortamda kolaylıkla çoğaltılabilmeleri ve  $I_{CRAC}$  akım ölçümlerinde çokça çalışılmış olmalarından dolayı çalışmamıza SOC kanallarından kaynaklanan akımların karakteristiklerini göstermek için dahil edilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin SOCE mekanizmasının gösterildiği ilk hücrelerden olmalarından dolayı çalışmamız için referans hücreler olarak belirlenmiştir. Şekil 4.2'den görüldüğü gibi SOCE, hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarının boşalmasına bağlı olarak zamanla gelişen ve bir maksimum seviyesine ulaştıktan sonra devamlılığını koruyan bir akım türüdür. RBL-1 üzerine elde edilen sonuçlar literatür bilgileri ile uyum içerisindedir. Yine RBL-1 hücre modeli, kardiyomiyositler üzerine planladığımız çalışma metoduna paralel olarak yüksek glikoz ortamında SOCE davranışını görmek adına çalışmamıza dahil edilmiştir. Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'den görüldüğü gibi Fura-2 tabanlı  $Ca^{2+}$  görüntüleme ve  $I_{CRAC}$  ölçümleri ile RBL-1 hücrelerinde SOCE aktivitesi yüksek glikoz ortamında anlamlı derecede artış göstermiştir. Ayrıca, Losartan inkübasyonunun bu artışı kontrol düzeyine döndürdüğü görülmektedir. Mast hücrelerde SOCE etkinliğinin hiperglisemi ile artışının gösterilmesi bu bulgularla uyum içerisindedir (Hong-Tao ve Beaven, 2010). RBL hücreleri mast hücrelere fonksiyonel açıdan benzerlikleri nedeniyle sıklıkla kullanılan hücre hatlarıdır.

SOCE başlangıçta sadece uyarılmayan hücrelerde bulunduğu düşünülse de daha sonra yapılan çalışmalarda bu  $Ca^{2+}$  giriş mekanizmasının nöronlarda, kardiyak miyositlerde, iskelet kasında ve vasküler düz kas hücrelerinde de bulunduğu ortaya konmuştur (Uehara ve ark., 2002; Parekh ve Putney, 2005; Targos ve ark., 2005; Darbellay ve ark., 2011; Pan ve ark., 2014). SOCE'nin çeşitli dokularda ve organ sistemlerinde çeşitli hücresel fonksiyonları düzenleyen bir  $Ca^{2+}$  sinyal yolu olduğu artık yaygın bir şekilde kabul edilmektedir (Feske, 2007; Abdullaev ve ark., 2008; Lyfenko ve Dirksen, 2008; Darbellay ve ark., 2009; Bisailon ve ark., 2010). Bu nedenle, SOC disfonksiyonunun immün yetmezlik, miyopati ve vasküler hastalıklar gibi bir dizi bozukluğa yol açması şaşırtıcı değildir (Feske, 2007; Zhao ve ark., 2008; Feske, 2009; Picard ve ark., 2009; Duke ve ark., 2010; Feske ve ark., 2010; Voelkers ve ark., 2010). Son zamanlarda elde edilen kanıtlar ile birlikte birçok diyabete bağlı komplikasyonun nedenleri arasında SOCE ve SOCE sinyal yollarındaki değişimlerin de olduğu anlaşılmıştır (Chung ve ark., 2009; Ding ve Triggle, 2010; Chaudhari, Wu, ve ark., 2014; Daskoulidou ve ark., 2015).

Diyabetik kardiyomiyopati, genellikle apoptotik hücre ölümü, genişlemesi ve kalp yetmezliğinin bir sonucu olarak kalp kütlesi kaybı ile sonuçlanır (Frustaci ve ark., 2000). Şekil 4.1 ve Tablo 4.1'den görüldüğü gibi diyabet gruplarındaki sıçanların kalp kütlelerindeki azalma neticesinde kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranlarının artışı ve ayrıca kan glikoz değerlerinin kontrol değerlere göre yaklaşık 4-kat yüksek olması karakteristik diyabet özelliğini sağladığını ortaya koymaktadır.

Kardiyomiyositlerde, SOCE'nin hipertrofik sinyal yollarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Voelkers ve ark., 2010; Hulot ve ark., 2011). Kardiyomiyositlerde artan miktarda STIM1 proteinin SOCE'yi güçlendirerek patolojik kardiyak hipertrofiye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Luo ve ark., 2012). Bununla birlikte, SOCE'nin diyabet kaynaklı kardiyak patojilerdeki rolü üzerine çalışmalar oldukça azdır.

Çalışmamızda YG ortamında Tg ile indüklenen SOCE aktivitesini ölçmek için hücre içi  $Ca^{2+}$  sinyal görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Embriyonik kardiyomiyosit hücre hattı olan H9C2, fonksiyonel açıdan yetişkin kardiyomiyositlerle oldukça benzer özellikler göstermektedir. Ayrıca kolaylıkla çoğaltılabilmeleri yönünden oldukça büyük avantaj sağlamaktadırlar. Bu anlamda embriyonik H9C2 kardiyomiyositler ile yetişkin kardiyak hücreler arasındaki SOCE yönünden farklılıkları görebilmek için kullanılmıştır.  $Ca^{2+}$  sinyal ölçümleri için Fura-2 tabanlı  $Ca^{2+}$  görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.6'dan görüldüğü gibi yüksek glikoz ortamının H9C2 kardiyomiyositlerde SOCE sinyallerinin anlamlı derecede artırdığı anlaşılmaktadır. Ayrıca yüksek glikoz ortamında losartan inkübasyonunun bu artışı engellediği görülmektedir. H9C2 hücre hatları tıpkı yetişkin kardiyomiyositler gibi AT1 reseptörlerini eksprese etmektedir (Gerena ve ark., 2017). Hiperglisemi ile artış gösteren reseptör yoğunluğu ve AngII molekülü etkinliğinin ARB (losartan) ile baskılanması neticesinde artış gösteren bu akımlar da baskılanacağı beklenir. Literatür bilgileri incelendiğinde H9C2 hücre hattı kullanılarak SOCE ölçümlerinin daha önce yapılmadığı görülmektedir.

Kültüre edilen neonatal sıçan ventriküler miyositleri üzerinde yapılan bir çalışmada kısa süreli hipergliseminin (20 saat, 30 mM) Ang II veya Tg ile indüklenen SOCE'yi önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir (Pang ve ark., 2002). Bu sonucun bizim çalışmamızda sıçan sol ventrikül hücrelerinden elde ettiğimiz sonuçlar ile tutarlı

olduğu görülmektedir. Şekil 4.8 görüldüğü gibi STZ ile gerçekleştirilen deneysel diyabet modeli sonucunda kardiyak miyositlerden ölçülen  $I_{CRAC}$  akımlarının kontrol değerlerine göre önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. Bu çalışmada elde edilen H9C2 embriyonik kardiyomiyosit hücre hattı ve yetişkin kardiyomiyosit hücreler arasında SOCE farklılığı gelişim süreci içerisinde SOC bileşenlerindeki (Stim/Orai ekspresyon) farklılaşmadan ve etkinliğindeki azalmadan ayrıca diyabetin *in vivo* ve *in vitro* olarak indüklenmesinin büyük farklılıklar oluşturmuş olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Bu sonuçların yanında diyabetin sıçan sol ventrikül hücrelerinde SOC kanal akımlarını arttırdığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. (Wang ve ark., 2017), STZ ile indüklenen diyabet modelinde ölçülen  $I_{CRAC}$  akımlarının kontrol değerine göre önemli derecede arttığını göstermişlerdir. Çalışmalarında bu artışın Stim/Orai proteinlerinin ekspresyonlarındaki artıştan kaynaklı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Yine Şekil 4.8'deki grafikler incelendiğinde SOC kanal blokörü olarak uygulanan SKF96365 (veya 2-APB, grafiklerde verilmemiştir)'nin kanal akımlarını inhibe etmediği görülmektedir. Benzer şekilde H9C2 embriyonik kardiyomiyositlerde de aynı durum görülmüştür. SOCE aktivitesi gözlenen H9C2 hücreler, 20 dk süreyle BTP2 ( $I_{CRAC}$  blokörü, 10  $\mu$ M) ile inkübe edilmiş ve BTP2'nin SOCE üzerinde bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır (Şekil 4.7). Zhao ve ark. sıçan ventrikül hücrelerinde yaptıkları çalışmada SOCE inhibitörü olarak BTP2 ve  $La^{3+}$  kullanmışlar ancak bizim çalışmamızda olduğu gibi akımlar üzerinde bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Ayrıca western blot çalışmaları ile Orai1 kanalının sol ventrikül hücrelerinde ekspresyonunun bulunmadığı sonuçlarına dayanarak bu blokörlerin  $I_{CRAC}$  akımları üzerine etkisinin olmayacağını düşünmüşlerdir. Bu yüzden Stim/Orai yolu üzerinden gerçekleşen sürecin kalpte tamamen farklı özellikte olduğunu ve Stim1 proteinin SR  $Ca^{2+}$  depolarının daha verimli doldurulmasında ve daha etkin kasılma gerçekleşmesinde rolü olabileceği şeklinde tartışmışlardır (Zhao ve ark., 2015). Ancak çalışmamız ve ayrıca literatür bilgileri göz önüne alındığında Orai proteinlerinin 3 izoformu da kalp hücrelerinde eksprese edildiği anlaşılmaktadır. Uygulanan blokörlerin akımlar üzerinde etki göstermemesinin sebebinin tam olarak anlaşılabilmesi için öncelikle farklı blokörler de uygulanarak deneyler tekrarlanmalıdır. Ayrıca hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarının boşalmasına bağlı olarak gerçekleşen SOC akımları sadece Stim/Orai üzerinden değil ayrıca TRP kanalları

üzerinden yani Stim1/Orai/TRP eksenini üzerinden de gerçekleşebilmektedir. Çalışmamızda SOCE blokörü olarak kullanılan SKF96365 TRP kanal (TRPC3, TRPC6) blokörü olarak da kullanılmaktadır. Bu yüzden Tg sonrası gerçekleşen akımların TRPC veya Orai üzerinden değil başka bir yolak üzerinden gerçekleştiği bulgusu literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır. Ayrıca kalp hücrelerinde ekspresyonu gösterilen Stim1L izoformunun direk olarak Orai1 kanalı ile etkileşim halinde olduğu ve hücre içine  $Ca^{2+}$  girişinin hızlı bir şekilde gerçekleşmesine olanak sağladığı gösterilmiştir (Darbellay ve ark., 2011). Bu yüzden kullanılan inhibitörlerin Stim1 blokörleri olması ve yeni tanımlanan Stim1L üzerine etkisinin henüz net olarak ortaya konulmamış olması nedeniyle bu akımların inhibisyonunda sorunla karşılaşıldığı düşünülmektedir. Çalışmamızda ve diğer bazı çalışmalarda (Zhao ve ark., 2015) inhibe edilemeyen bu akımların hangi yolak üzerinden gerçekleştiğinin aydınlatılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Diğer yandan diyabetin RAS sistemi üzerine etkileri göz önüne alındığında lokal olarak kalpte diyabet ile birlikte RAS elemanlarının sayılarının arttığı çok iyi bilinmektedir. Literatür bilgileri incelendiğinde diyabetin Ang II ve AT1 reseptör yoğunluklarını arttırdığı görülmektedir (Sechi ve ark., 1994; Malhotra ve ark., 1997; Fiordaliso ve ark., 2000). Bilindiği üzere GPCR aktivasyonu neticesinde PLC-IP3 yolağı üzerinden hücre içi depolardan  $Ca^{2+}$  salınımı gerçekleşmektedir. GPCR ailesinin bir üyesi olan AT1 reseptörlerinin ve Ang II sinyali bileşenlerinin diyabetik durumlardaki artışlarının oluşturduğu hücre içi  $Ca^{2+}$  homeostazındaki bozukluklar ARB veya ACE uygulamaları ile düzeltildiği daha önce gösterilmiştir (Shimoni, 2001; Yaras ve ark., 2005). Bu anlamda artan AngII ve AT1 reseptörlerinin, SR depolarından salınan  $Ca^{2+}$  üzerinde etkisinin olabileceği ve depolardaki bu değişimlerin SOCE yolağının etkinliğini değiştirebileceği düşüncesiyle, çalışmamızda bir ARB olan losartan'ın 4-hafta süre ile uygulanmasının SOC kanal akımlarına etkisi araştırılmıştır. Şekil 4.8'den görüldüğü gibi DM grubunda azalan  $I_{CRAC}$  akımları DM + Los grubunda kontrol değerlerine yaklaşmıştır. Ayrıca K ve K + Los grupları arasında anlamlı bir değişim görülmemiştir. Bu anlamda RAS sistemi ve SOCE arasında bir bağlantı olduğu düşünülmektedir. Her ne kadar kalp hücreleri oldukça korunaklı bir  $Ca^{2+}$  osilasyonuna sahip olsa da SOC kanallarının bu sistemin önemli bir parçası olduğunu düşündürmektedir. Özellikle de diyabetik durumda SR  $Ca^{2+}$  depolarının içeriğinin azalması ve SOC kanallarının depo bağımlı olarak

çalışıyor olması göz önüne alındığında, SOC kanalları üzerine geliştirilecek tedavi yöntemlerinin diyabetik kardiyomiyopati hastalığının ilerlemesi veya baskılanması noktasında bir umut ışığı olabileceği düşünülmektedir. Zhao ve ark. sıçan ventrikül hücreleri üzerine yaptıkları çalışmada Stim1 proteinin fosfolamban proteinine bağlanarak SERCA2a proteinin aktif durumda kalmasını ve böylelikle SR  $Ca^{2+}$  içeriğinin artırılmasına ve daha etkin kasılma gerçekleşmesine imkan sağladığını göstermişlerdir (Zhao ve ark., 2015). Bu anlamda sadece SOCE yolağı üzerinde görev alan proteinler değil aynı zamanda bu proteinlerin kalpte  $Ca^{2+}$  regülasyonundaki temel proteinlerle (PLB, SERCA2, RyR, VGCC gibi) olan etkileşimlerinin belirlenmesi büyük önem arz etmektedir.

Çalışmamızda ayrıca Stim ve Orai protein ailelerinin kalpteki ekspresyon seviyeleri de incelenmiştir. Stim1 ve Orai2 proteinin ekspresyonunda tüm gruplar açısından herhangi bir değişim görülmemiştir. Stim2 proteinin ekspresyonu anlamlı olmasa da DM grubunda hafifçe arttığı görülmektedir. Orai1 ve Orai3 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde ise DM ve DM + Los gruplarında ekspresyonların anlamlı derecede arttığı görülmektedir. SOC akımlarındaki değişimlerin sebebi SOCE ile ilişkili proteinlerin değişen ekspresyonundan veya proteinler arasındaki etkileşimlerdeki fonksiyonel bozukluklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bu anlamda kalp hücresi gibi oldukça karmaşık ve korunaklı bir sistem üzerinde hücre içi  $Ca^{2+}$  depolarının boşalmasına bağlı olarak aktive olan bu akımların hangi yolak üzerinden geliştiği çok daha kapsamlı bir şekilde incelenmeli ve ayrıca protein-protein (TRP/Orai gibi) etkileşimleri de göz önüne alınmalıdır. Diyabetin gelişimi ile görülen akımlardaki azalmalar ile protein ekspresyonlarındaki artış arasındaki tutarsızlık ise sadece kalp hücrelerinde değil başka hücre türlerinde de karşılaşılmıştır. T2DM hastalarından alınan trombositlerde SOCE'nin sağlıklı bireylerden elde edilen değerlere göre azaldığını ancak SOCE yolağı proteinlerinden Stim1/Orai1 ekspresyonlarının arttığını ve TRPC1'lerin ise değişmediğini göstermişlerdir (Zbidi ve ark., 2009). Bu nedenle, diyabetik trombositlerde SOCE'nin zayıflaması, Stim1 proteini ve kanal proteinleri (Orai1/TRPC'ler) arasındaki fonksiyonel bağlantının bozulmasından kaynaklanabileceğini düşünmüşlerdir. Anormal SOCE ve diyabetik komplikasyonların gelişimi ile ilgili daha fazla bilginin elde edilmesiyle birlikte, SOCE'nin belirli düzenleyicilerinin geliştirilmesi, çeşitli diyabetik komplikasyonlar için stratejik bir seçenek olacaktır. Diyabetin küresel

çapta etkisi göz önüne alındığında, hastalığın muazzam yükünü azaltmak için ek terapatik ajanların araştırılması şarttır. SOCE ve moleküler bileşenleri (Stim1/Orai1, Stim1/Orai1/TRPC, Stim1L/Orai1), diyabetik komplikasyonları olan hastalar için yeni bir terapötik hedef olabilir.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda diyabetin neden olduğu kardiyomiyopatide SOC akımlarının nasıl etkilendiği, diyabetik durumda kalpte lokal olarak artan Ang II sinyal yolağının inhibisyonunun bu kanal akımlarına olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla tüm deney gruplarında  $I_{CRAC}$  akım ölçümlerinin yanında bu yolak üzerinde etkili olan proteinlerin biyokimyasal çalışmaları yapılmıştır.

Çalışmamıza 3 farklı hücre türü dahil edilmiş ve her birinde SOCE ölçümleri gerçekleştirilmiştir. RBL-1 bazofilik lösemi hücreleri ve H9C2 embriyonik kardiyomiyosit hücre hattında yüksek glikoz ortamında  $I_{CRAC}$  akımlarının arttığı ve losartan inkübasyonunun bu artışı engellediği görülmüştür.

Yetişkin kardiyomiyositlerde ise  $I_{CRAC}$  akımlarının diyabetik durumda azaldığı tespit edilmiştir. 4-hafta süre ile uygulanan losartan'ın (30 mg/kg) bu akımları kontrol değerine getirdiği bulunmuştur. H9C2 embriyonik kardiyomiyositler ve yetişkin kardiyomiyositler arasında görülen bu farklılık embriyonik dönemde SOCE'nin daha baskın olmasından kaynaklanıyor olabilir. Örneğin, kardiyomiyositlerde IP3 reseptörlerinin mRNA seviyelerinin olgunlaşma ile birlikte azaldığı RyR'lerini ise arttığı gösterilmiştir (Go ve ark., 1995). Bu süreç yetişkin kardiyomiyositlerde SOCE'nin etkinliğinin azalmasına neden olabilir.

Sıçan sol ventrikül hücrelerinde Tg veya kafein ile indüklenen SOC akımlarına bilinen 2 farklı blokörü (SKF96365 veya 2-APB) farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Ancak depo bağımlı olarak ortaya çıkan bu akımların bu inhibitörlere cevap vermediği gözlenmiştir. Benzer durum H9C2 embriyonik kardiyomiyositlerde görülmüştür. Tg ile indüklenen SOCE üzerine BTP2 blokörünün bir etkisinin olmadığı bulunmuştur. Bu durumun sebebi, SOCE yolağının kalpte işleyen mekanizması diğer hücrelerde gözlemlenen Stim1/Orai1 üzerinde olduğundan daha farklı bir şekilde (Stim/Orai/TRP veya Stim1L/Orai1 ) gerçekleşiyor olması veya yapısal farklılıkların çalışma mekanizmasını değiştirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

SOCE yolağı üzerinde etkili olan Stim ve Orai proteinlerinin ekspresyon seviyeleri yetişkin sıçan ventrikül hücrelerinde diyabetik durumda nasıl etkilendiği

biyokimyasal yöntemlerle incelenmiştir. Stim1, Stim2 ve Orai2 protein ekspresyonlarında herhangi bir değişim görülmezken, Orai1 ve Orai3 ekspresyonlarının artış gösterdiği tespit edilmiştir. Losartan tedavisinin ise diyabetik durumda artan protein ekspresyonları üzerinde etkisinin olmadığı görülmüştür. Protein seviyelerindeki artışa akımlar düzeyinde azalmanın eşlik etmesi ise proteinler (Stim1/Orai1-3, Stim1L/Orai1) arasındaki etkileşimlerin bozulmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak kardiyomiyositlerde hücre içi  $Ca^{2+}$  regülasyonunu sağlayan temel proteinlerin (RyR, SERCA, SR, PLB, VGCC v.b.) yanında SOC kanal proteinlerinin de önemli olduğu ve diyabetik kardiyomiyopati gibi patolojik durumlarda bozulan hücre içi  $Ca^{2+}$  homeostazisinin nedenleri arasında SOC kanal bileşenlerinde meydana gelen fonksiyonel bozuklukların da olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca diyabetik durumda artan AngII ve AT1 gibi RAS bileşenlerinin doğrudan veya dolaylı olarak SOCE yolağı ile bağlantılı olduğu görülmektedir.

Diyabetik durumun kalpte neden olduğu  $Ca^{2+}$  regülasyonundaki bozukluklarda SOCE yolağının rolünün daha iyi anlaşılabilmesi için öncelikle SOCE'nin hangi yolak üzerinden gerçekleştiği farklı blokörler uygulanarak belirlenmelidir. Son olarak SOCE ile ilgili proteinlerin (Stim1/Orai1, Stim1L/Orai1)  $Ca^{2+}$  homeostazisinde görev alan temel proteinlerle olan etkileşimleri detaylı bir şekilde incelenmelidir.

## KAYNAKLAR

- Abe T, Ohga Y, Tabayashi N, Kobayashi S, Sakata S, Misawa H. Left ventricular diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus model rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282 (1): H138-148.
- Abdullaev IF, Bisailon JM, Potier M, Gonzalez JC, Motiani RK, Trebak M. Stim1 and orai1 mediate crac currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circ Res*. 2008; 103 (11): 1289-1299.
- Arison RN, Ciaccio EI, Glitzer MS, Cassaro JA, Pruss MP. Light and electron microscopy of lesions in rats rendered diabetic with streptozotocin. *Diabetes*. 1967; 16 (1): S1-85.
- Bartoli F, Sabourin J. Cardiac remodeling and disease: Current understanding of stim1/orai1-mediated store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in cardiac function and pathology. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 993: 523-534.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4 (7): 517-529.
- Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002; 415 (6868): 198-205.
- Bird GS, Hwang SY, Smyth JT, Fukushima M, Boyles RR., Putney JW, Jr. Stim1 is a calcium sensor specialized for digital signaling. *Curr Biol*. 2009; 19 (20): 1724-1729.
- Bisailon JM, Motiani RK, Gonzalez-Cobos JC, Potier M, Halligan KE, Alzawahra WF, Trebak M. Essential role for stim1/orai1-mediated calcium influx in pdgf-induced smooth muscle migration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010; 298 (5): C993-1005.
- Bootman MD, Rietdorf K. Tissue specificity: Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in cardiac myocytes. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 993: 363-387.

Borgatta L, Watras J, Katz AM, Ehrlich BE. Regional differences in calcium-release channels from heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88 (6): 2486-2489.

Brandman O, Liou J, Park WS, Meyer T. Stim2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> levels. *Cell*. 2007; 131 (7): 1327-1339.

Bugger H, Boudina S, Hu XX, Tuinei J, Zaha VG, Theobald HA, Abel ED. Type 1 diabetic akita mouse hearts are insulin sensitive but manifest structurally abnormal mitochondria that remain coupled despite increased uncoupling protein 3. *Diabetes*. 2008; 57 (11): 2924-2932.

Casis O, Echevarria E. Diabetic cardiomyopathy: Electromechanical cellular alterations. *Curr Vasc Pharmacol*. 2004; 2 (3): 237-248.

Chappell MC. Nonclassical renin-angiotensin system and renal function. *Compr Physiol*. 2012; 2 (4): 2733-2752.

Chaudhari SY, Ruknuddin G, Biswajyoti JP, Kumar PP. Effect of tamra bhasma (calcined copper) on ponderal and biochemical parameters. *Toxicol Int*. 2014; 21 (2): 156-159.

Chaudhari S, Wu P, Wang Y, Ding Y, Yuan J, Begg M, Ma R. High glucose and diabetes enhanced store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and increased expression of its signaling proteins in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014; 306 (9): F1069-1080.

Cheng H, Lederer, WJ. Calcium sparks. *Physiol Rev*. 2008; 88 (4): 1491-1545.

Chiu HC, Kovacs A, Blanton RM, Han X, Courtois M, Weinheimer, C. J. Transgenic expression of fatty acid transport protein 1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy. *Circ Res*. 2005; 96 (2): 225-233.

Chung AW, Au Yeung K, Chum E, Okon EB, van Breemen C. Diabetes modulates capacitative calcium entry and expression of transient receptor potential canonical channels in human saphenous vein. *Eur J Pharmacol*. 2009; 613 (1-3): 114-118.

Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*. 2007; 131 (6): 1047-1058.

Collins HE, He L, Zou L, Qu J, Zhou L, Litovsky SH. Stromal interaction molecule 1 is essential for normal cardiac homeostasis through modulation of  $er$  and mitochondrial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014; 306 (8): H1231-1239.

Collins HE, Zhu-Mauldin X, Marchase RB., Chatham JC. Stim1/orai1-mediated  $soce$ : Current perspectives and potential roles in cardiac function and pathology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013; 305 (4): H446-458.

Connelly KA., Boyle AJ, Kelly DJ. Angiotensin II and the cardiac complications of diabetes mellitus. *Curr Pharm Des*. 2007; 13 (26): 2721-2729.

Correll RN, Goonasekera SA, van Berlo JH., Burr AR., Accornero F, Zhang H. Stim1 elevation in the heart results in aberrant  $ca(2)(+)$  handling and cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2015; 87: 38-47.

Dabelea D, Bell, RA., D'Agostino RB, Jr, Imperatore G, Johansen JM., Linder B, Waitzfelder B. Incidence of diabetes in youth in the united states. *JAMA*. 2007; 297 (24): 2716-2724.

Darbellay B, Arnaudeau S, Bader CR, Konig S, Bernheim L. Stim11 is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive  $ca2+$  release. *J Cell Biol*. 2011; 194 (2): 335-346.

Darbellay B, Arnaudeau, S, Konig S, Jousset H, Bader, C, Demaurex N, Bernheim L. Stim1- and orai1-dependent store-operated calcium entry regulates human myoblast differentiation. *J Biol Chem*. 2009; 284 (8): 5370-5380.

Daskoulidou N, Zeng B, Berglund LM, Jiang H, Chen GL, Kotova O, Xu SZ. High glucose enhances store-operated calcium entry by upregulating orai/stim via Calcineurin-NFAT signalling. *J Mol Med (Berl)*. 2015; 93 (5): 511-521.

DeHaven WI, Smyth JT, Boyles, RR., Putney JW, Jr. Calcium inhibition and calcium potentiation of orai1, orai2, and orai3 calcium release-activated calcium channels. *J Biol Chem*. 2007; 282 (24): 17548-17556.

Delbalzo U, Rosen MR, Malfatto G, Kaplan LM., Steinberg SF. Specific alpha-1-adrenergic receptor subtypes modulate catecholamine-induced increases and decreases in ventricular automaticity. *Circulation Research*. 1990; 67 (6): 1535-1551.

Deng X, Wang Y, Zhou Y, Soboloff J, Gill DL. Stim and orai: Dynamic intermembrane coupling to control cellular calcium signals. *J Biol Chem*. 2009; 284 (34): 22501-22505.

Desai PN, Zhang X, Wu S, Janoshazi A, Bolimuntha S, Putney JW, Trebak M. Multiple types of calcium channels arising from alternative translation initiation of the orai1 message. *Sci Signal*. 2015; 8 (387): ra74.

Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L, Guatimosim S. Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension*. 2008; 52 (3): 542-548.

Ding H, Triggle CR. Endothelial dysfunction in diabetes: Multiple targets for treatment. *Pflugers Arch*. 2010; 459 (6): 977-994.

Dominguez-Rodriguez A, Ruiz-Hurtado G, Sabourin J, Gomez AM, Alvarez JL, Benitah JP. Proarrhythmic effect of sustained epac activation on trpc3/4 in rat ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2015; 87: 74-78.

Duke AM, Hopkins PM, Calaghan SC, Halsall JP, Steele DS. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in malignant hyperthermia-susceptible human skeletal muscle. *J Biol Chem*. 2010; 285 (33): 25645-25653.

Eckel J, Gerlach-Eskuchen E, Reinauer H. Alpha-adrenoceptor-mediated increase in cytosolic free calcium in isolated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1991; 23 (5): 617-625.

Eder P, Molkentin JD. TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2011; 108 (2): 265-272.

Eisner DA, Caldwell JL, Kistamas K, Trafford, AW. Calcium and excitation-contraction coupling in the heart. *Circ Res*. 2017; 121 (2): 181-195.

Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7 (7-8): 1040-1052.

Felner EI, Klitz W, Ham M, Lazaro AM, Stastny P, Dupont B, White PC. Genetic interaction among three genomic regions creates distinct contributions to early- and late-onset type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes*. 2005; 6 (4): 213-220.

Felner EI, Klitz W, Ham M, Lazaro AM, Stastny P, Dupont B. Genetic interaction among three genomic regions creates distinct contributions to early- and late-onset type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes*. 2005; 6 (4): 213-220.

Felzen B, Berke G, Gardner P, Binah O. Involvement of the ip3 cascade in the damage to guinea-pig ventricular myocytes induced by cytotoxic t lymphocytes. *Pflugers Arch*. 1997; 433 (6): 721-726.

Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7 (9): 690-702.

Feske S. Orai1 and stim1 deficiency in human and mice: Roles of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in the immune system and beyond. *Immunol Rev*. 2009; 231 (1): 189-209.

Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH., Tanasa B, Rao A. A mutation in orai1 causes immune deficiency by abrogating crac channel function. *Nature*. 2006; 441 (7090): 179-185.

Feske S, Picard C, Fischer A. Immunodeficiency due to mutations in orai1 and stim1. *Clin Immunol*. 2010; 135 (2): 169-182.

Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D, Limana F, Safai B, Nadal-Ginard B. Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes*. 2001; 50 (10): 2363-2375.

Fiordaliso F, Li B, Latini R, Sonnenblick EH, Anversa P, Leri A. Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats is angiotensin ii- dependent. *Lab Invest*. 2000; 80 (4): 513-527.

Folli F, Corradi D, Fanti P, Davalli A, Paez A, Giaccari A. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular

complications: Avenues for a mechanistic-based therapeutic approach. *Curr Diabetes Rev.* 2011; 7 (5): 313-324.

Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res.* 2000; 87 (12): 1123-1132.

Fukushima M, Tomita T, Janoshazi A, Putney JW. Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of orai1 with distinct plasma membrane mobilities. *J Cell Sci.* 2012; 125 (Pt 18): 4354-4361.

Fukuta H, Little WC. The cardiac cycle and the physiologic basis of left ventricular contraction, ejection, relaxation, and filling. *Heart Fail Clin.* 2008; 4 (1): 1-11.

Gale EA, Gillespie, KM. Diabetes and gender. *Diabetologia.* 2001; 44 (1): 3-15.

Gerana Y, Lozada JG, Collazo BJ, Alvarez JM, Estrada JM, De Mello W. Losartan counteracts the effects of cardiomyocyte swelling on glucose uptake and insulin receptor substrate-1 levels. *Peptides.* 2017; 96: 38-43.

Go LO, Moschella MC, Watras J, Handa KK, Fyfe BS, Marks AR. Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *J Clin Invest.* 1995; 95 (2): 888-894.

Gomes ER, Lara AA, Almeida PW, Guimaraes D, Resende RR, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. *Hypertension.* 2010; 55 (1): 153-160.

Gorza L, Schiaffino S, Volpe P. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in heart: Evidence for its concentration in purkinje myocytes of the conduction system. *J Cell Biol.* 1993; 121 (2): 345-353.

Haim TE, Wang W, Flagg TP, Tones MA, Bahinski A, Numann RE. Palmitate attenuates myocardial contractility through augmentation of repolarizing kv currents. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 48 (2): 395-405.

Hansson L, Lindholm LH, Ekbom T, Dahlof, B, Lanke, J, Schersten B. Randomised trial of old and new antihypertensive drugs in elderly patients: Cardiovascular



mortality and morbidity the swedish trial in old patients with hypertension-2 study. *Lancet*. 1999; 354 (9192): 1751-1756.

Hansson L, Lindholm LH., Niskanen L, Lanke J, Hedner T, Niklason A. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: The captopril prevention project (capp) randomised trial. *Lancet*. 1999; 353 (9153): 611-616.

Holscher ME, Bode C, Bugger H. Diabetic cardiomyopathy: Does the type of diabetes matter? *Int J Mol Sci*. 2016; 17 (12).

Horton JS, Buckley CL, Alvarez EM, Schorlemmer A, Stokes AJ. The calcium release-activated calcium channel orai1 represents a crucial component in hypertrophic compensation and the development of dilated cardiomyopathy. *Channels (Austin)*. 2014; 8 (1): 35-48.

Hoth M., Niemeyer BA. The neglected crac proteins: Orai2, orai3, and stim2. *Curr Top Membr*. 2013; 71: 237-271.

Hoth M, Penner R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*. 1992; 355 (6358): 353-356.

Hoth M, Penner R. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol*. 1993; 465: 359-386.

Hulot JS, Fauconnier J, Ramanujam D, Chaanine A, Aubart F, Sassi Y. Critical role for stromal interaction molecule 1 in cardiac hypertrophy. *Circulation*. 2011; 124 (7): 796-805.

Hunton DL, Lucchesi PA, Pang Y, Cheng X, Dell'Italia LJ, Marchase RB. Capacitative calcium entry contributes to nuclear factor of activated t-cells nuclear translocation and hypertrophy in cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2002; 277 (16): 14266-14273.

Isfort M, Stevens SC, Schaffer S, Jong CJ, Wold LE. Metabolic dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Heart Fail Rev*. 2014; 19 (1): 35-48.

- Jalili T, Takeishi Y, Walsh RA. Signal transduction during cardiac hypertrophy: the role of G $\alpha$ q, PLC  $\beta$ I, and PKC. *Cardiovasc Research*. 1999; 44 (1): 5-9.
- Jardin I, Lopez JJ, Zbidi H, Bartegi A, Salido GM., Rosado, JA. Attenuated store-operated divalent cation entry and association between stim1, orai1, htrpc1 and htrpc6 in platelets from type 2 diabetic patients. *Blood Cells Mol Dis*. 2011; 46 (3): 252-260.
- Ji Y, Guo X, Zhang Z, Huang Z, Zhu J, Chen QH. Camkiidelta meditates phenylephrine induced cardiomyocyte hypertrophy through store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Cardiovasc Pathol*. 2017; 27: 9-17.
- Jia G, DeMarco VG, Sowers JR. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol*. 2016; 12 (3): 144-153.
- Kanamori H, Takemura G, Goto K, Tsujimoto A, Mikami A, Ogino A. Autophagic adaptations in diabetic cardiomyopathy differ between type 1 and type 2 diabetes. *Autophagy*. 2015; 11 (7): 1146-1160.
- Kijima Y, Saito A, Jetton TL, Magnuson MA., Fleischer S. Different intracellular localization of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 1993; 268 (5): 3499-3506.
- Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of mapk signaling pathways in human diseases. *Bba-Mol Basis Dis*. 2010; 1802 (4): 396-405.
- Kim MS, Hong JH, Li Q, Shin DM, Abramowitz J, Birnbaumer L, Muallem S. Deletion of TRPC3 in mice reduces store-operated Ca<sup>2+</sup> influx and the severity of acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 2009; 137 (4): 1509-1517.
- Kim MS, Zeng W, Yuan JP, Shin DM, Worley PF, Muallem S. Native store-operated Ca<sup>2+</sup> influx requires the channel function of orai1 and TRPC1. *J Biol Chem*. 2009; 284 (15): 9733-9741.
- Kojima A, Kitagawa H, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Nosaka S. Presence of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in c57bl/6j mouse ventricular myocytes and its suppression by sevoflurane. *Br J Anaesth*. 2012; 109 (3): 352-360.

Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51 (2): 216-226.

Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S. Stretch-mediated release of Angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the bcl-2-to-bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest*. 1998; 101 (7): 1326-1342.

Liao Y, Plummer NW, George MD, Abramowitz J, Zhu MX, Birnbaumer L. A role for orai in trpc-mediated  $Ca^{2+}$  entry suggests that a trpc:Orai complex may mediate store and receptor operated  $Ca^{2+}$  entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106 (9): 3202-3206.

Lijnen, PJ, Petrov VV, Fagard, RH. Induction of cardiac fibrosis by angiotensin ii. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2000; 22 (10): 709-723.

Lindholm LH, Ibsen H, Dahlof B, Devereux RB., Beevers G, de Faire U. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the losartan intervention for endpoint reduction in hypertension study (life): A randomised trial against atenolol. *Lancet*. 2002; 359 (9311): 1004-1010.

Lis A, Peinelt C, Beck A, Parvez S, Monteilh-Zoller M, Fleig A, Penner R. Cracm1, cracm2, and cracm3 are store-operated  $Ca^{2+}$  channels with distinct functional properties. *Curr Biol*. 2007; 17 (9): 794-800.

Lithell H, Hansson L, Skoog I, Elmfeldt D, Hofman A, Olofsson B. The study on cognition and prognosis in the elderly (scope): Principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertens*. 2003; 21 (5): 875-886.

Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Jr, Meyer T. Stim is a  $Ca^{2+}$  sensor essential for  $Ca^{2+}$ -store-depletion-triggered  $Ca^{2+}$  influx. *Curr Biol*. 2005; 15 (13): 1235-1241.

Liu J, Xin L, Benson VL, Allen DG, Ju YK. Store-operated calcium entry and the localization of stim1 and orai1 proteins in isolated mouse sinoatrial node cells. *Front Physiol*. 2015; 6: 69.

Liu SJ, Kennedy RH.  $\alpha_1$ -Adrenergic activation of L-type Ca current in rat ventricular myocytes: perforated patch-clamp recordings. *Am J Physiol.* 1998; 274: 6.

Luo X, Hojaye B, Jiang N, Wang ZV, Tandan S, Rakalin A. Stim1-dependent store-operated  $Ca^{2+}$  entry is required for pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52 (1): 136-147.

Lyfenko AD, Dirksen, RT. Differential dependence of store-operated and excitation-coupled  $Ca^{2+}$  entry in skeletal muscle on stim1 and orai1. *J Physiol.* 2008; 586 (20): 4815-4824.

Mackenzie L, Bootman MD, Laine M, Berridge MJ, Thuring J. The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in  $Ca^{2+}$  signalling and the generation of arrhythmias in rat atrial myocytes. *J Physiol.* 2002; 1 (541): 395-409.

Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial (allhat). *JAMA.* 2002; 288 (23): 2981-2997.

Malhotra A, Reich D, Reich D, Nakouzi A, Sanghi V, Geenen DL, Buttrick PM. Experimental diabetes is associated with functional activation of protein kinase c epsilon and phosphorylation of troponin i in the heart, which are prevented by angiotensin ii receptor blockade. *Circ Res.* 1997; 81 (6): 1027-1033.

Mamoulakis D, Galanakis E, Bicouvarakis S, Paraskakis E, Sbyrakis S. Epidemiology of childhood type i diabetes in crete, 1990-2001. *Acta Paediatr.* 2003; 92 (6): 737-739.

Molitch ME, Adler AI, Flyvbjerg A, Nelson RG, So WY, Wanner C. Diabetic kidney disease: A clinical update from kidney disease: Improving global outcomes. *Kidney Int.* 2015; 87 (1): 20-30.

Molkentin JD, Dorn GW. Cytoplasmic signalling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol.* 2001; 63: 391-426.

Moschella MC, Marks AR. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression in cardiac myocytes. *J Cell Biol.* 1993; 120 (5): 1137-1146.

Motiani RK, Abdullaev IF, Trebak M. A novel native store-operated calcium channel encoded by *orai3*: Selective requirement of *orai3* versus *orai1* in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2010; 285 (25): 19173-19183.

Muscogiuri G, Salmon AB, Aguayo-Mazzucato C, Li M, Balas B, Guardado-Mendoza R. Genetic disruption of *sod1* gene causes glucose intolerance and impairs beta-cell function. *Diabetes.* 2013; 62 (12): 4201-4207.

Ntountaniotis D, Mali G, Grdadolnik SG, Maria H, Skaltsounis AL, Potamitis C. Thermal, dynamic and structural properties of drug AT1 antagonist olmesartan in lipid bilayers. *Bba-Biomembranes.* 2011; 1808 (12): 2995-3006.

Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Sato T, Ono K, Ito H. Essential role of *stim1* in the development of cardiomyocyte hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 389 (1): 172-176.

Ohba T, Watanabe H, Murakami M, Takahashi Y, Ino K, Kuromitsu S. Upregulation of *trpc1* in the development of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42 (3): 498-507.

Ong EC., Nesin V, Long CL, Bai CX, Guz JL, Ivanov IP, Tsiokas L. A TRPC1 protein-dependent pathway regulates osteoclast formation and function. *J Biol Chem.* 2013; 288 (31): 22219-22232.

Pan Z, Brotto M, Ma J. Store-operated  $Ca^{2+}$  entry in muscle physiology and diseases. *BMB Rep.* 2014; 47 (2): 69-79.

Pang Y, Hunton DL, Bounelis P, Marchase RB. Hyperglycemia inhibits capacitative calcium entry and hypertrophy in neonatal cardiomyocytes. *Diabetes.* 2002; 51 (12): 3461-3467.

Parekh AB, Putney JW, Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* 2005; 85 (2): 757-810.

Parvez S, Beck A, Peinelt C, Soboloff J, Lis A, Monteilh-Zoller M. Stim2 protein mediates distinct store-dependent and store-independent modes of crac channel activation. *FASEB J.* 2008; 22 (3): 752-761.

Patterson CC., Dahlquist GG., Gyurus E, Green A, Soltesz G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: A multicentre prospective registration study. *Lancet.* 2009; 373 (9680): 2027-2033.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 2006; 86 (3): 747-803.

Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL. Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: The charm-overall programme. *Lancet.* 2003; 362 (9386): 759-766.

Picard C, McCarl CA, Papolos A, Khalil S, Luthy K, Hivroz C, Feske S. Stim1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity. *N Engl J Med.* 2009; 360 (19): 1971-1980.

Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG. Orai1 is an essential pore subunit of the crac channel. *Nature.* 2006; 443 (7108): 230-233.

Putney JW. Origins of the concept of store-operated calcium entry. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011; 3: 980-984.

Putney JW. Alternative forms of the store-operated calcium entry mediators, stim1 and orai1. *Curr Top Membr.* 2013; 71: 109-123.

Putney JW, Jr, Bird GS. The inositol phosphate-calcium signaling system in nonexcitable cells. *Endocr Rev.* 1993; 14 (5): 610-631.

Putney JW, Jr, McKay RR. Capacitative calcium entry channels. *Bioessays.* 1999; 21 (1): 38-46.

Rajaei E, Jalali MT, Shahrabi S, Asnafi AA, Pezeshki, SM. S. Hlas in autoimmune diseases: Dependable diagnostic biomarkers? *Curr Rheumatol Rev.* 2019; 15 (4): 269-276.

Rincon-Choles H, Kasinath BS, Gorin Y, Abboud HE. Angiotensin II and growth factors in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 2002; (82): S8-11.

Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Stauderman KA. Stim1, an essential and conserved component of store-operated  $Ca^{2+}$  channel function. *J Cell Biol.* 2005; 169 (3): 435-445.

Rosenkranz AC, Hood S G, Woods RL, Dusting GJ, Ritchie RH. B-type natriuretic peptide prevents acute hypertrophic responses in the diabetic rat heart: Importance of cyclic gmp. *Diabetes.* 2003; 52 (9): 2389-2395.

Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol.* 1972; 30 (6): 595-602.

Ruhle B, Trebak M. Emerging roles for native orai  $ca^{2+}$  channels in cardiovascular disease. *Curr Top Membr.* 2013; 71: 209-235.

Sabourin J, Bartoli F, Antigny F, Gomez AM, Benitah JP. Transient receptor potential canonical TRPC/Orai1-dependent store-operated  $Ca^{2+}$  channels: New targets of aldosterone in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2016; 291 (25): 13394-13409.

Santos RA, Castro CH, Gava E, Pinheiro SV, Almeida AP., Paula RD. Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1-7) receptor mas knockout mice. *Hypertension.* 2006; 47 (5): 996-1002.

Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension.* 2005; 45 (5): 828-833.

Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. Stz transport and cytotoxicity. Specific enhancement in glut2-expressing cells. *Diabetes.* 1994; 43 (11): 1326-1333.

Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M. The cardiac renin-angiotensin system in stz-induced diabetes. *Diabetes.* 1994; 43 (10): 1180-1184.

Schiffrin EI, Touyz RM. Multiple action of angiotensin II in hypertension. *J. of the American Coll. of Cardiology*. 2003; 42 (5): 911-913.

Shao Q, Saward L, Zahradka P, Dhalla SN. Ca<sup>2+</sup> mobilization in adult rat cardiomyocytes by angiotensin type 1 and type 2 receptors. *Biochemical Pharmacology*. 1998; 55 (9): 1413-1418.

Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pr*. 2010; 87 (1): 4-14.

Shimoni Y. Inhibition of the formation or action of Angiotensin II reverses attenuated K<sup>+</sup> currents in type 1 and type 2 diabetes. *J Physiol*. 2001; 537 (Pt 1): 83-92.

Shuttleworth TJ. Orai channels - new insights, new ideas. *J Physiol*. 2012; 590 (17): 4155-4156.

Sigala I, Zacharatos P, Toumpanakis D, Michailidou T, Nougia O, Theocharis S. MAPKs and NF- $\kappa$ B differentially regulate cytokine expression in the diaphragm in response to resistive breathing: The role of oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011; 300 (5): R1152-1162.

Silva-Filho JL, Souza MC, Henriques M, Morrot A, Savino W, Nunes MP. AT1 receptor-mediated Angiotensin II activation and chemotaxis of T lymphocytes. *Mol Immunol*. 2011; 48 (15-16): 1835-1843.

Soboloff J, Spassova MA, Hewavitharana T, He LP, Xu W, Johnstone LS. Stim2 is an inhibitor of Stim1-mediated store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Curr Biol*. 2006; 16 (14): 1465-1470.

Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: An update. *Hypertension*. 2001; 37 (4): 1053-1059.

Steinberg SF, Robinson RB, Lieberman HB, Stern DM, Rosen MR. Thrombin modulates phosphoinositide metabolism, cytosolic calcium, and impulse initiation in the heart. *Circ Res*. 1991; 68 (5): 1216-1229.



Stiber J, Hawkins A, Zhang ZS, Wang S, Burch J, Graham V. Stim1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol.* 2008; 10 (6): 688-697.

Sundgren NC, Giraud GD, Schultz JM, Lasarev MR, Stork PJ, Thornburg KL. Extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositol-3 kinase mediate igf-1 induced proliferation of fetal sheep cardiomyocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 285 (6): R1481-1489.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001; 50 (6): 537-546.

Talukder MA, Kalyanasundaram A, Zuo L, Velayutham M, Nishijima Y, Periasamy M. Is reduced SERCA2a expression detrimental or beneficial to postischemic cardiac function and injury? Evidence from heterozygous serca2a knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 294 (3): H1426-1434.

Targos B, Baranska J, Pomorski P. Store-operated calcium entry in physiology and pathology of mammalian cells. *Acta Biochim Pol.* 2005; 52 (2): 397-409.

Thastrup O, Dawson AP, Scharff O, Foder B, Cullen PJ, Drobak BK. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions.* 1989; 27 (1-2): 17-23.

Touchberry CD, Elmore CJ, Nguyen TM, Andresen JJ, Zhao X, Orange M. Store-operated calcium entry is present in hl-1 cardiomyocytes and contributes to resting calcium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 416 (1-2): 45-50.

Touyz RM, Fareh J, Thibault G, Tolloczko B, Lariviere R., Schiffrin EL. Modulation of Ca<sup>2+</sup> transients in neonatal and adult rat cardiomyocytes by Angiotensin II and endothelin-1. *Am J Physiol.* 1996; 270 (3 Pt 2): H857-868.

Tuomilehto J. The emerging global epidemic of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2013; 13 (6): 795-804.

Uehara A, Yasukochi M, Imanaga, I, Nishi M, Takeshima H. Store-operated  $Ca^{2+}$  entry uncoupled with ryanodine receptor and junctional membrane complex in heart muscle cells. *Cell Calcium*. 2002; 31 (2): 89-96.

Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL. The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat Cell Biol*. 2002; 4 (11): E263-272.

Vermes E, Tardif JC, Bourassa MG., Racine N, Levesque S, White M. Enalapril decreases the incidence of atrial fibrillation in patients with left ventricular dysfunction: Insight from the studies of left ventricular dysfunction (solvd) trials. *Circulation*. 2003; 107 (23): 2926-2931.

Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kinet JP. Cracm1 is a plasma membrane protein essential for store-operated  $Ca^{2+}$  entry. *Science*. 2006; 312 (5777): 1220-1223.

Voelkers M, Salz M, Herzog N, Frank D, Dolatabadi N, Frey N. Orai1 and stim1 regulate normal and hypertrophic growth in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2010; 48 (6): 1329-1334.

Volkers M, Dolatabadi N, Gude N, Most P, Sussman MA, Hassel D. Orai1 deficiency leads to heart failure and skeletal myopathy in zebrafish. *J Cell Sci*. 2012; 125 (2): 287-294.

Wang J, Fu J, Li J, Wang Y, Tang L, Bai SW. Enhanced store-operated  $Ca^{2+}$  entry in high glucose-cultured neonatal and adult diabetic rat cardiomyocytes. *Int J Clin Exp Patho*. 2017; 10 (2): 877-889.

Wang P, Umeda PK, Sharifov OF, Halloran BA, Tabengwa E, Grenett HE. Evidence that 2-aminoethoxydiphenyl borate provokes fibrillation in perfused rat hearts via voltage-independent calcium channels. *Eur J Pharmacol*. 2012; 681 (1-3): 60-67.

Wang SQ, Song LS, Lakatta EG, Cheng H.  $Ca^{2+}$  signalling between single l-type  $Ca^{2+}$  channels and ryanodine receptors in heart cells. *Nature*. 2001; 410 (6828): 592-596.

Wang Y, Deng X, Gill DL. Calcium signaling by stim and orai: Intimate coupling details revealed. *Sci Signal*. 2010; 3 (148): pe42.

Westermeier F, Riquelme JA, Pavez M, Garrido V, Diaz A, Verdejo HE. New molecular insights of insulin in diabetic cardiomyopathy. *Front Physiol*. 2016; 7: 125.

Worley PF, Zeng W, Huang GN, Yuan JP, Kim J.Y, Lee MG, Muallem S. TRPC channels as stim1-regulated store-operated channels. *Cell Calcium*. 2007; 42 (2): 205-211.

Wu MM, Buchanan J, Luik RM, Lewis RS. Ca<sup>2+</sup> store depletion causes stim1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol*. 2006; 174 (6): 803-813.

Yaras N, Ugur M, Ozdemir S, Gurdal H, Purali N, Lacampagne A, Vassort G, Turan B. Effects of diabetes on ryanodine receptor Ca release channel (RyR2) and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in rat heart. *Diabetes*. 2005; 54 (11): 3082-3088.

Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF, Muallem S. Stim1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol*. 2007; 9 (6): 636-645.

Yuill KH, Tosh D, Hancox JC. Streptozotocin-induced diabetes modulates action potentials and ion channel currents from the rat atrioventricular node. *Exp Physiol*. 2010; 95 (4): 508-517.

Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med*. 2000; 342 (3): 145-153.

Zbidi H, Lopez JJ, Amor NB, Bartegi A, Salido GM, Rosado JA. Enhanced expression of stim1/orai1 and TRPC3 in platelets from patients with type 2 diabetes mellitus. *Blood Cells Mol Dis*. 2009; 43 (2): 211-213.

Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH. Stim1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates crac channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature*. 2005; 437 (7060): 902-905.

Zhao G, Li T, Brochet DX, Rosenberg PB, Lederer WJ. Stim1 enhances SR Ca<sup>2+</sup> content through binding phospholamban in rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112 (34): E4792-4801.

Zhao X, Weisleder N, Thornton A, Oppong Y, Campbell R, Ma J, Brotto M. Compromised store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in aged skeletal muscle. *Aging Cell*. 2008; 7 (4): 561-568.

Zhou Y, Srinivasan P, Razavi S, Seymour S, Meraner P, Gudlur A. Initial activation of stim1, the regulator of store-operated calcium entry. *Nat Struct Mol Biol*. 2013; 20 (8): 973-981.

Zhu-Mauldin X, Marsh SA, Zou L, Marchase RB, Chatham JC. Modification of stim1 by o-linked n-acetylglucosamine (o-glcnac) attenuates store-operated calcium entry in neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2012; 287 (46): 39094-39106.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Yasin	<b>Uyruğu</b>	T.C
<b>Soyadı</b>	Gökçe	<b>Tel no</b>	
<b>Doğum tarihi</b>	03/03/1986	<b>e-posta</b>	yasingokce@akdeniz.edu.tr

### Eğitim Bilgileri

	<b>Mezun olduğu kurum</b>	<b>Mezuniyet yılı</b>
<b>Lise</b>	Kayseri Argıncık Lisesi	2004
<b>Lisans</b>	Süleyman Demirel Üniversitesi	2010
<b>Yüksek Lisans</b>	Selçuk Üniversitesi	2013

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (yıl-yıl)</b>
<b>Araş. Gör.</b>	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi	<b>2011-2014</b>
<b>Araş. Gör.</b>	Akdeniz Üniversitesi	<b>2014-2020</b>

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Sınav türü</b>	<b>Puanı</b>
<b>İngilizce</b>	ÜDS	<b>72,5</b>

### Proje Deneyimi

<b>Proje Adı</b>	<b>Destekleyen kurum</b>	<b>Süre (Yıl-Yıl)</b>
<b>Yurtdışı Araştırma Bursu</b>	YÖK Bursu ile US Ohio State Üniversitesi	2013-2013 (6ay)
<b>Öğrenci Değişim Programı</b>	ERASMUS Belçika, KU Leuven Üniversitesi	2017-2017 (3ay)
<b>Yurtdışı Doktora Bursu</b>	TÜBİTAK İngiltere, Cambridge Üniversitesi	2019-2020 (12 ay)

### Yayınlar:

1. Ates S., **Gökçe Y.**, Celik G., Yildiz M., "Oscillator strengths and transition probabilities for singly ionized terbium", CANADIAN JOURNAL OF PHYSICS, vol.92, pp.1043-1046, 2014.
2. Ozturk I.K., Celik G., **Gökçe Y.**, Atalay B., Guzelcimen F., Er A., et al., "Transition probabilities of neutral scandium", CANADIAN JOURNAL OF PHYSICS, vol.92, pp.1425-1429, 2014.

3. **Gökçe Y.**, Celik G., Yildiz M., "Electric quadrupole transition probabilities and line strengths of  $Ti^{11+}$ ", ATOMIC DATA AND NUCLEAR DATA TABLES, vol.100, pp.835-846, 2014.
4. Yildiz M., **Gökçe Y.**, "Lifetimes for singly ionized nitrogen", CANADIAN JOURNAL OF PHYSICS, vol.92, pp.82-85, 2014.
5. Celik G., **Gökçe Y.**, Yildiz M., "Electric quadrupole transition probabilities for atomic lithium", ATOMIC DATA AND NUCLEAR DATA TABLES, vol.100, pp.792-801, 2014.
6. Yildiz M., **Gökçe Y.**, Celik G., "Electric dipole radiative lifetimes for neutral boron atom", INDIAN JOURNAL OF PHYSICS AND PROCEEDINGS OF THE INDIAN ASSOCIATION FOR THE CULTIVATION OF SCIENCE, vol.87, pp.1069-1073, 2013.

#### **Diğer Yayınlar:**

7. Dalaman U., **Gökçe Y.**, Basrali F., Yaraş N., "Araşidonik Asit Metaboliti 20-Hete'nin Kardiyak Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi Üzerine Akut Etkisi, F.Ü.Sağ.Bil.Tıp.Derg., 2020; 34 (2): 00 – 00.

#### **Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:**

Dalaman U., Yaraş N., **Gökçe Y.**, "ARAŞİDONİK ASİT METABOLİTİ 20-HETE'NİN KARDİYOMİYOSİT ÜZERİNE ELEKTROFİZYOLOJİK ETKİLERİ", 28-29. Ulusal biyofizik mkongresi, İSTANBUL, TÜRKİYE, 6-9 Eylül 2017, ss.6-6.

Dalaman U., **Gökçe Y.**, Yaraş N., "Kalp yetmezliğinde Aksiyon Potansiyelinin Uzamasına Katkı Sağlayan Geç Sodyum Akımlarına Bir Gazotransmitter Olan  $SO_2$ 'nin Etkisi", 27. Ulasal Biyofizik Kongresi, MALATYA, TÜRKİYE, 29 Eylül - 3 Ekim 2015, ss.1-1.