



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**İVABRADİNİN KARDİYOVASKÜLER PLEİOTROPİK  
ETKİLERİNİN VE BU ETKİLERE ARACILIK EDEN  
MEKANİZMALARIN STREPTOZOTOSİN DİYABET  
MODELİNDE İNCELENMESİ**

**Zümra KARA**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Arzu ONAY BEŞİKCİ**

**ANKARA  
2020**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İVABRADİNİN KARDİYOVASKÜLER PLEİOTROPİK  
ETKİLERİNİN VE BU ETKİLERE ARACILIK EDEN  
MEKANİZMALARIN STREPTOZOTOSİN DİYABET  
MODELİNDE İNCELENMESİ**

**Zümra KARA**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Arzu ONAY BEŞİKCİ**

**Bu araştırma TÜBİTAK 1001 -Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini  
Destekleme Programı 116S631 numaralı proje ile desteklenmiştir.**

**ANKARA**  
**2020**

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “İvabradinin Kardiyovasküler Pleiotropik Etkilerinin ve Bu Etkilere Aracılık Eden Mekanizmaların Streptozotosin Diyabet Modelinde İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Zümra KARA

Tarih:

İmza:

## İÇİNDEKİLER

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Etik Beyan                                                                   | ii        |
| İçindekiler                                                                  | iii       |
| Önsöz                                                                        | v         |
| Simgeler ve Kısaltmalar                                                      | vii       |
| Şekiller                                                                     | xi        |
| Çizelgeler                                                                   | xiii      |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                              | <b>1</b>  |
| 1.1. Kalp Atım Hızı ve Kardiyovasküler Hastalıklar Arasındaki İlişki         | 6         |
| 1.2. HCN Kanalları                                                           | 8         |
| 1.2.1. HCN Kanallarının Fizyolojisi ve Aktivasyonu                           | 9         |
| 1.2.2. HCN Kanalının İzofomları ve Bu İzofomların Lokalizasyonu              | 13        |
| 1.3. İvabradinin Fizyolojik ve Pleiotropik Kardiyovasküler Etkileri          | 14        |
| 1.4. Diyabet ve Kardiyovasküler Komplikasyonları                             | 18        |
| 1.4.1. Diyabet ve Vasküler Fonksiyon Bozukluğu Arasındaki İlişki             | 19        |
| 1.4.2. Diyabet ve Kardiyak Fonksiyon Bozukluğu Arasındaki İlişki             | 22        |
| 1.5. Diyabet ve İvabradin Çalışmaları                                        | 23        |
| 1.6. HCN Kanallarının Ekspresyonlarının Değiştiği Durumlar                   | 28        |
| <b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                                                    | <b>33</b> |
| 2.1. Kullanılan Gereçler                                                     | 34        |
| 2.1.1. Cihazlar                                                              | 34        |
| 2.1.2. Kimyasal Maddeler                                                     | 36        |
| 2.1.3. Antikorlar                                                            | 38        |
| 2.2. Sıçanlarda Gerçekleştirilen Çalışmalar                                  | 39        |
| 2.2.1. Beden Ağırlıkları ve Kan Şekeri Ölçümleri                             | 41        |
| 2.2.2. Kan Basıncı ve Kalp Atım Hızı Parametrelerinin Ölçümü                 | 41        |
| 2.2.3. İzole Organ Banyosu ile Damar Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi      | 42        |
| 2.2.4. Histolojik İncelemeler                                                | 44        |
| 2.2.4.1. Crossman'ın Üçlü Boyaması                                           | 45        |
| 2.2.4.2. DAF-2DA Boyaması                                                    | 45        |
| 2.2.4.3. DHE Boyaması                                                        | 46        |
| 2.2.5. Biyokimyasal İncelemeler                                              | 46        |
| 2.2.6. Western Blot                                                          | 47        |
| 2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları                                               | 50        |
| 2.3.1. HUVEC'lerde Gerçekleştirilen Çalışmalar                               | 50        |
| 2.3.2. H9c2 Hücrelerde Gerçekleştirilen Çalışmalar                           | 51        |
| 2.4. İstatistiksel Analizler                                                 | 52        |
| 2.5. Yazım ve Grafiklerin Oluşturulması                                      | 53        |
| <b>3. BULGULAR</b>                                                           | <b>54</b> |
| 3.1. Sıçanların Genel Özellikleri                                            | 54        |
| 3.2. STZ-Diyabet ve İvabradinin Kan Basıncı ve Kalp Atım Hızı Üzerine Etkisi | 55        |
| 3.3. STZ-Diyabet ve İvabradinin Aort Kasılma Yanıtları Üzerine Etkileri      | 56        |

|                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.4. STZ-Diyabet ve İvabradinin Aort Gevşeme Yanıtları Üzerine Etkileri                       | 59  |
| 3.5. İvabradinin Damar Gevşetici Etkisinin Değerlendirilmesi ve Mekanizmasının Aydınlatılması | 61  |
| 3.6. Histolojik İncelemelerin Sonuçları                                                       | 64  |
| 3.6.1. Crossman'ın Üçlü Boyaması ile Elde Edilen Sonuçlar                                     | 64  |
| 3.6.2. DAF-2DA Boyaması ile Elde Edilen Sonuçlar                                              | 67  |
| 3.6.3. DHE Boyaması ile Elde Edilen Sonuçlar                                                  | 70  |
| 3.7. Biyokimyasal İncelemelerin Sonuçları                                                     | 73  |
| 3.8. Sıçanlarda Gerçekleştiren Western Blot Çalışmalarının Sonuçları                          | 74  |
| 3.8.1. Aort Dokusundaki Western Blot Çalışmalarının Sonuçları                                 | 74  |
| 3.8.2. Kalp Dokusundaki Western Blot Çalışmalarının Sonuçları                                 | 76  |
| 3.9. HUVEC'lerde Gerçekleştirilen Çalışmaların Sonuçları                                      | 79  |
| 3.10. H9c2 Hücrelerde Gerçekleştirilen Çalışmaların Sonuçları                                 | 81  |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                                                                            | 85  |
| <b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                                                                   | 95  |
| <b>ÖZET</b>                                                                                   | 99  |
| <b>SUMMARY</b>                                                                                | 100 |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                                              | 101 |
| <b>EKLER</b>                                                                                  | 117 |
| Ek-1. Etik Kurul Onay Raporu                                                                  | 117 |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                               | 118 |

## ÖNSÖZ

İvabradin, sinoatriyal düğümde  $I_f$  (f, funny) kanalının selektif inhibitörüdür ve kalbin kontraktilitesini etkilemeksizin, hem dinlenme durumundaki hem de egzersizle indüklenen kalp atım hızını azaltmaktadır. Bu etkisi nedeniyle ivabradin günümüzde kalp yetmezliği ve anjina pectoris tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kardiyovasküler yararlı etkilerinin yalnızca kalp atım hızını azaltmasından kaynaklanmadığını gösteren pek çok deneysel ve klinik araştırma verisi bulunmasına rağmen ivabradinin bu etkilerinin mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu tez çalışmasında ivabradinin sağlıklı ve diyabetik damarlarda vasküler yanıtları nasıl etkilediği ve bu etkiye aracılık eden mekanizmaların belirlenmesi, oksidatif stres ve hipertrofi üzerine etkisinin olup olmadığının tespit edilmesi amaçlanmıştır. İvabradinin diyabetik endotel disfonksiyonu iyileştirdiği ve bu etkiye ivabradinin oksidatif stresi önleyici, antihipertrofik etkilerinin de aracılık ettiği tespit edilmiştir. Böylece bu çalışma ile ivabradinin pleiotropik kardiyovasküler yararlı etkilerine aracılık eden mekanizmalar hakkında fikir edinilmiştir. İvabradinin diyabetik endotel hasarını engelleyici/azaltıcı ve/veya antihipertrofik pleiotropik etkilerinin gösterilmesi ABD, Kanada ve çoğu Avrupa ülkesinde zaten kullanılmakta olan ivabradinin diyabetik kardiyovasküler komplikasyonları engellemek için de kullanılabilmesine temel oluşturacaktır.

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

Doktora eğitimim boyunca ve hayatımın her alanında bilgi, tecrübe ve deneyimleri ile yolumu aydınlatan, her türlü problemle baş edebilmemi ve sorumluluk almamı sağlayan, bilim insanı olma yolunda bana örnek olan, her zaman bende ki yeri çok özel olan danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Arzu Beşikçi'ye,

Bilgi ve deneyimlerini her zaman özveriyle ve fedakarca paylaşarak yardımları ile yol gösterici olan değerli hocalarım Doç. Dr. Ebru Arıoğlu İnan ve Doç. Dr. Işıl Özakca Gündüz'e,

Doktora sürecimin tüm aşamalarında yardımları ile gece gündüz beni destekleyerek, enerjimin her zaman yüksek kalmasını sağlayan, tüm anılarımın ortağı, en büyük destekçilerimden biri olan kıymetli dostum Dr. Berna Güven'e,

Deneyisel çalışmalarım sırasında desteklerini, bilgi ve tecrübelerini paylaşarak büyük katkı sağlayan Prof. Dr. Hikmet Altunay ve Arş. Gör. Nuh Yıldırım'a,

Desteklerini ve yardımlarını her zaman bana hissettiren, hem çalışmalarım da hem de özel hayatımda fedakarlıkları ile yanımda olan, değerli arkadaşlarım Dr. Didem Yılmaz Oral, Ecz. Mine Zambak, Ecz. Betül Erdoğan, Ecz. İrem Karaömerlioğlu, Ecz. Zeynep Elif Yeşilyurt, Ecz. Elif Müderrisoğlu, Ecz. Gizem Özkan, Ecz. Uzm. Ecz. Sadık Ahmet Canan, Ecz. Heba Asker ve Mim. Mertkan Çelik'e

Beni asla yalnız bırakmayan, bu zorlu süreçte bana büyük destek veren, sıkıntılarımı paylaşan, yardımlarıyla tezime büyük katkıda bulunan ve bana her zaman güç veren erkek arkadaşım Ahmet Sarı'ya,

Daima bana güvenen, tercihlerimin arkasında durarak beni destekleyen, bu süreçte fiziksel olarak bir arada olamasak da her zaman koşulsuz bir şekilde yanımda olduklarını bana en derinden hissettiren canım annem ve babama,

Doktora süreci boyunca sağladıkları burs (2211A-Genel Yurt içi Doktora Burs Program) ve proje desteği (SBAG-116S631) sebebiyle TÜBİTAK'a

**SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                     |                                                                                                                                                    |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| %                   | Yüzde                                                                                                                                              |
| $\alpha$            | Alfa                                                                                                                                               |
| ACEİ                | Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörü<br>( <i>Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor</i> )                                                    |
| Akt                 | Protein Kinaz B                                                                                                                                    |
| ANP                 | Atriyal Natriüretik Peptid                                                                                                                         |
| ApoE <sup>-/-</sup> | Apolipoprotein E-Eksik<br>( <i>Apolipoprotein E-deficient</i> )                                                                                    |
| APS                 | Amonyum Persülfat                                                                                                                                  |
| ARB                 | Anjiyotensin Reseptör Blokeri                                                                                                                      |
| ASSOCIATE           | <i>Evaluation of the Antianginal Efficacy and Safety of the Association of the If Current Inhibitor Ivabradine with Beta-blocker</i>               |
| ATP                 | Adenozin Trifosfat                                                                                                                                 |
| $\beta$             | Beta                                                                                                                                               |
| $\beta$ -AR         | Beta Adrenerjik Reseptör                                                                                                                           |
| BCA                 | Bikinkoninik Asit<br>( <i>Bicinchoninic Acid</i> )                                                                                                 |
| BEAUTIFUL           | <i>Morbidity-mortality Evaluation of the I<sub>f</sub> Inhibitor Ivabradine in Patients with Coronary Disease and Left Ventricular Dysfunction</i> |
| BNP                 | Beyin Natriüretik Peptid                                                                                                                           |
| Bpm                 | Dakikadaki Atım Sayısı<br>( <i>Beats Per Minute</i> )                                                                                              |
| BSA                 | Sığır Serum Albumini<br>( <i>Bovine Serum Albumin</i> )                                                                                            |
| C                   | Karbon                                                                                                                                             |
| Ca <sup>+2</sup>    | Kalsiyum İyonu                                                                                                                                     |
| cAMP                | Siklik Adenozin Monofosfat<br>( <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i> )                                                                            |
| CARVIVA HF          | <i>Effect of Carvedilol, Ivabradine or Their Combination on Exercise Capacity in Patients with Heart Failure</i>                                   |
| CD4                 | Farklılaşma Kümesi 4<br>( <i>Cluster of Differentiation 4</i> )                                                                                    |

|                  |                                                                                                                                               |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| cGMP             | Siklik Guanozin Monofosfat<br>( <i>Cyclic Guanosine Monophosphate</i> )                                                                       |
| CL               | Döngü Uzunluğu<br>( <i>Cycle Lenght</i> )                                                                                                     |
| DAF-2DA          | 4,5-Diaminoflorosein Diasetat                                                                                                                 |
| Dak              | Dakika                                                                                                                                        |
| DAPI             | 4',6-Diamidino-2-Fenilindol Diklorür                                                                                                          |
| DHE              | Dihidroetidyum                                                                                                                                |
| DMEM             | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>                                                                                                       |
| DMSO             | Dimetil Sülfoksit                                                                                                                             |
| ECL              | Artırılmış Kemilüminesans<br>( <i>Enhanced Chemiluminescence</i> )                                                                            |
| EDHF             | Endotel Kaynaklı Hiperpolarizan Faktör<br>( <i>Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor</i> )                                               |
| EDTA             | Etilen Diamin Tetra Asetik Asit                                                                                                               |
| ELISA            | İmmünoenzimatik Yöntem<br>( <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> )                                                                        |
| EMA              | Avrupa İlaç Ajansı<br>( <i>European Medicines Agency</i> )                                                                                    |
| E <sub>max</sub> | Maksimum Etki                                                                                                                                 |
| eNOS             | Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz                                                                                                                |
| FBS              | Fetal Sığır Serumumu<br>( <i>Fetal Bovine Serum</i> )                                                                                         |
| FDA              | Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu<br>( <i>U.S. Food and Drug Administration</i> )                                                                  |
| FMD              | Akış Aracılı Dilatasyon<br>( <i>Flow-Mediated Dilation</i> )                                                                                  |
| g                | Gram                                                                                                                                          |
| GAPDH            | Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz                                                                                                           |
| HbA1c            | Hemoglobin A1c                                                                                                                                |
| HCN              | Hiperpolarizasyon ile Aktive Olan Siklik Nükleotid Kapılı Kanallar<br>( <i>Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channels</i> ) |
| HRP              | <i>Horseradish</i> Peroksidaz                                                                                                                 |
| HUVEC            | İnsan Umblikal Ven Endotel Hücresi<br>( <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i> )                                                        |

|                 |                                                                                       |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| ICAM-1          | Hücre İçi Adhezyon Molekülü-1<br>( <i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i> )         |
| I <sub>f</sub>  | <i>f, funny</i>                                                                       |
| IL-1            | İnterlökin-1                                                                          |
| INITIATIVE      | <i>International Trial on the Treatment of Angina with Ivabradine versus Atenolol</i> |
| i.p             | İntraperitoneal                                                                       |
| IRS             | İnsülin Reseptör Substratı                                                            |
| JNK             | C-Jun N-Terminal Kinaz                                                                |
| K <sup>+</sup>  | Potasyum İyonu                                                                        |
| kDa             | Kilodalton                                                                            |
| L-NAME          | N <sub>ω</sub> -Nitro-L-Arjinin Metil Ester Hidroklorür                               |
| LVEF            | Sol Ventrikül Ejeksiyon Fraksiyonu<br>( <i>Left Ventricular Ejection Fraction</i> )   |
| MAPK            | Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz<br>( <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> )     |
| mg              | Miligram                                                                              |
| MI              | Miyokard İnfarktüsü                                                                   |
| μM              | Mikro Molar                                                                           |
| mRNA            | Mesajcı Ribonükleik Asit                                                              |
| mV              | Milivolt                                                                              |
| N               | Azot<br>( <i>Nitrogen</i> )                                                           |
| Na <sup>+</sup> | Sodyum İyonu                                                                          |
| NADPH           | İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat                                     |
| NFκB            | Nükleer Faktör-kappa B                                                                |
| NMD             | Endotelden Bağımsız Dilatasyon<br>( <i>Nitroglycerin-Mediated Dilation</i> )          |
| NO              | Nitrik Oksit                                                                          |
| NOS             | Nitrik Oksit Sentaz                                                                   |
| NYHA            | New York Kalp Derneği<br>( <i>New York Heart Association</i> )                        |
| p-Akt           | Fosforile-Akt                                                                         |
| PBS             | Fosfat Tamponlu Salin<br>( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )                         |

|               |                                                                                                                            |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pEC50         | Maksimum Etkinin %50'sini Oluşturan Konsantrasyonun Negatif Logaritması                                                    |
| p-eNOS        | Fosforile-eNOS                                                                                                             |
| PI3K          | Fosfoinozotid-3-Kinaz<br>( <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i> )                                                              |
| PIK           | Proteaz İnhibitör Kokteyli                                                                                                 |
| PP2Ac         | Protein Fosfataz 2A Katalitik Alt Ünitesi                                                                                  |
| PROP          | Propranolol                                                                                                                |
| PVDF          | Polivinilidin Florür                                                                                                       |
| RIPA          | Radyoimmünopresipitasyon Tampon Çözeltisi<br>( <i>Radioimmunoprecipitation Assay Buffer</i> )                              |
| RIVENDEL      | <i>Heart Rate Reduction by Ivabradine for Improvement of Endothelial Function in Patients with Coronary Artery Disease</i> |
| ROS           | Reaktif Oksijen Türleri<br>( <i>Reactive Oxygen Species</i> )                                                              |
| S4            | Dördüncü Segment                                                                                                           |
| sa            | Saat                                                                                                                       |
| SDS           | Sodyum Dodesil Sülfat                                                                                                      |
| SHIFT         | <i>Systolic Heart Failure Treatment with the I<sub>f</sub> Inhibitor Ivabradine Trial</i>                                  |
| siRNA         | Susturucu Ribonükleik Asit                                                                                                 |
| SKB           | Sistolik Kan Basıncı                                                                                                       |
| SNP           | Sodyum Nitroprussid                                                                                                        |
| SOD           | Süperoksid Dismutaz                                                                                                        |
| STZ           | Streptozotosin                                                                                                             |
| TBS           | Trisle Tamponlanmış Salin<br>( <i>Tris-Buffered Saline</i> )                                                               |
| TEA           | Tetraetilamonyum Klorür                                                                                                    |
| TEMED         | Tetrametiletildiamin                                                                                                       |
| TG            | Tris/Glisin                                                                                                                |
| TGS           | Tris/Glisin/Sodyum Dodesil Sülfat                                                                                          |
| TİTCK         | Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu                                                                                         |
| TNF- $\alpha$ | Tümör Nekroz Faktör Alfa                                                                                                   |
| VCAM-1        | Vasküler Adhezyon Molekülü-1<br>( <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i> )                                               |

## ŞEKİLLER

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Stabil Anjina Pektoris Tedavi Stratejisi                                                                                         | 2  |
| Şekil 1.2. Kalp Yetmezliği Tedavi Stratejisi                                                                                                | 3  |
| Şekil 1.3. Kalp Atım Hızı ile Kardiyovasküler Olay Gelişimi Arasındaki İlişki                                                               | 7  |
| Şekil 1.4. HCN Kanalının Yapısı                                                                                                             | 8  |
| Şekil 1.5. HCN Kanalının İvabradin ile Etkileşmesi                                                                                          | 9  |
| Şekil 1.6. <i>Pacemaker</i> Hücrelerde Membran Potansiyeli                                                                                  | 10 |
| Şekil 1.7. Sinoatriyal Düğümde <i>Pacemaker</i> Potansiyelinin Oluşmasına Katkı Sağlayan İyon Kanalları ve Membran Potansiyelindeki Değişim | 11 |
| Şekil 1.8. Kardiyak Miyositlerde Aksiyon Potansiyeli                                                                                        | 12 |
| Şekil 1.9. İvabradinin Etki Mekanizması                                                                                                     | 15 |
| Şekil 1.10. İvabradinin Fizyolojik Etkileri                                                                                                 | 15 |
| Şekil 1.11. Diyabet ve Vasküler Fonksiyon Bozuklukları                                                                                      | 21 |
| Şekil 1.12. Diyabet ve Kardiyak Fonksiyon Bozuklukları                                                                                      | 22 |
| Şekil 2.1. İvabradinin Kardiyovasküler Yararlı Etkilerinin Hayvan ve Hücre Kültürü Çalışmaları ile İncelenmesi                              | 34 |
| Şekil 2.2. Sıçanların Tedavi Protokolünün Şematik Gösterimi                                                                                 | 40 |
| Şekil 2.3. Torasik Aortanın Yağ ve Bağ Dokusunun Temizlenmesi                                                                               | 43 |
| Şekil 2.4. Torasik Aortanın Organ Banyosuna Asılması                                                                                        | 44 |
| Şekil 2.5. Laminar Akımlı Kabinde Hücrelerin Kültür Plâğına Bölünmesi                                                                       | 51 |
| Şekil 3.1. Sıçanların Genel Özellikleri                                                                                                     | 55 |
| Şekil 3.2. Torasik Aortanın Kasilma Yanıtları                                                                                               | 58 |
| Şekil 3.3. Torasik Aortada Asetilkolin, İzoprenalin ve SNP ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları                                                | 60 |
| Şekil 3.4. Torasik Aortada İvabradin ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları                                                                      | 62 |
| Şekil 3.5. Torasik Aortada İvabradin ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtlarının Mekanizması                                                       | 63 |
| Şekil 3.6. Aort Kesitlerinde Crossman'ın Üçlü Boyaması                                                                                      | 65 |
| Şekil 3.7. Sol Ventrikül Kesitlerinde Crossman'ın Üçlü Boyaması                                                                             | 66 |
| Şekil 3.8. Aort Kesitlerinde DAF-2DA Boyaması                                                                                               | 68 |
| Şekil 3.9. Sol Ventrikül Kesitlerinde DAF-2DA Boyaması                                                                                      | 69 |

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 3.10.</b> Aort Kesitlerinde DHE Boyaması                                             | 71 |
| <b>Şekil 3.11.</b> Sol Ventrikül Kesitlerinde DHE Boyaması                                    | 72 |
| <b>Şekil 3.12.</b> SOD, p-selektin ve VCAM-1 Ölçümleri                                        | 73 |
| <b>Şekil 3.13.</b> Aort Dokusunda HCN İzoformlarının Miktarı                                  | 75 |
| <b>Şekil 3.14.</b> Aort Dokusunda eNOS ve Akt Fosforilasyonları                               | 76 |
| <b>Şekil 3.15.</b> Sol Ventrikül Dokusunda HCN İzoformlarının Miktarları                      | 77 |
| <b>Şekil 3.16.</b> Atrium Dokusunda HCN İzoformlarının Miktarları                             | 78 |
| <b>Şekil 3.17.</b> Atrium Dokusunda ANP Miktarı                                               | 79 |
| <b>Şekil 3.18.</b> HUVEC’lerde HCN İzoformlarının Miktarları                                  | 80 |
| <b>Şekil 3.19.</b> HUVEC’lerin p-eNOS ve eNOS Protein Miktarları                              | 81 |
| <b>Şekil 3.20.</b> H9c2 Hücrelerde Hipertrofi Modelinin Oluşturulması ve İvabradinin Etkileri | 82 |
| <b>Şekil 3.21.</b> H9c2 Hücrelerde ANP Protein Miktarı                                        | 83 |
| <b>Şekil 3.22.</b> Hayvan ve Hücre Kültürü Çalışmalarının Sonuçlarının Şematik Gösterimi      | 84 |

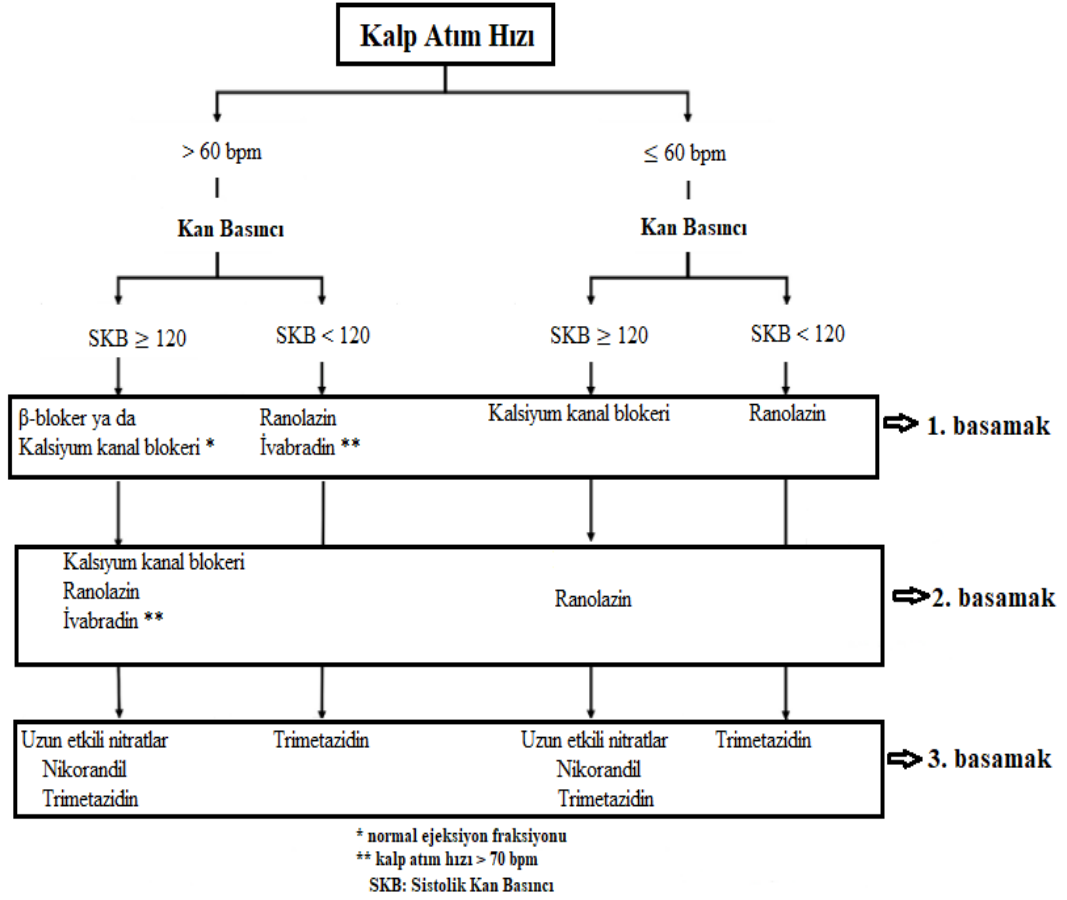
## ÇİZELGELER

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 1.1.</b> HCN İzofomlarının Lokalizasyonu, cAMP Duyarlılığı, Aktivasyon Hızı ve Voltaj Değeri                    | 14 |
| <b>Çizelge 1.2.</b> Diyabet ve İvabradin Çalışmaları                                                                       | 26 |
| <b>Çizelge 2.1.</b> Cihazlar                                                                                               | 35 |
| <b>Çizelge 2.2.</b> Kimyasal Maddeler                                                                                      | 36 |
| <b>Çizelge 2.3.</b> Antikorlar                                                                                             | 38 |
| <b>Çizelge 2.4.</b> Deney Gruplarındaki Hayvanların Dağılımı                                                               | 40 |
| <b>Çizelge 2.5.</b> Ayırıcı Jel Formülasyonu                                                                               | 48 |
| <b>Çizelge 2.6.</b> Yükleme Jel Formülasyonu                                                                               | 48 |
| <b>Çizelge 2.7.</b> Western Blot ile İncelenen Proteinler ve İncelendikleri Dokular                                        | 49 |
| <b>Çizelge 3.1.</b> Tedavinin 1. ve 3. Haftalarındaki Kan Basıncı ve Kalp Atım Hızı Değerleri (Hemodinamik Ölçümler)       | 56 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> Fenilefrin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarının $pEC_{50}$ ve $E_{max}$ Değerleri                      | 59 |
| <b>Çizelge 3.3.</b> Asetilkolin, İzoprenalin ve SNP ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtlarının $pEC_{50}$ ve $E_{max}$ Değerleri | 61 |

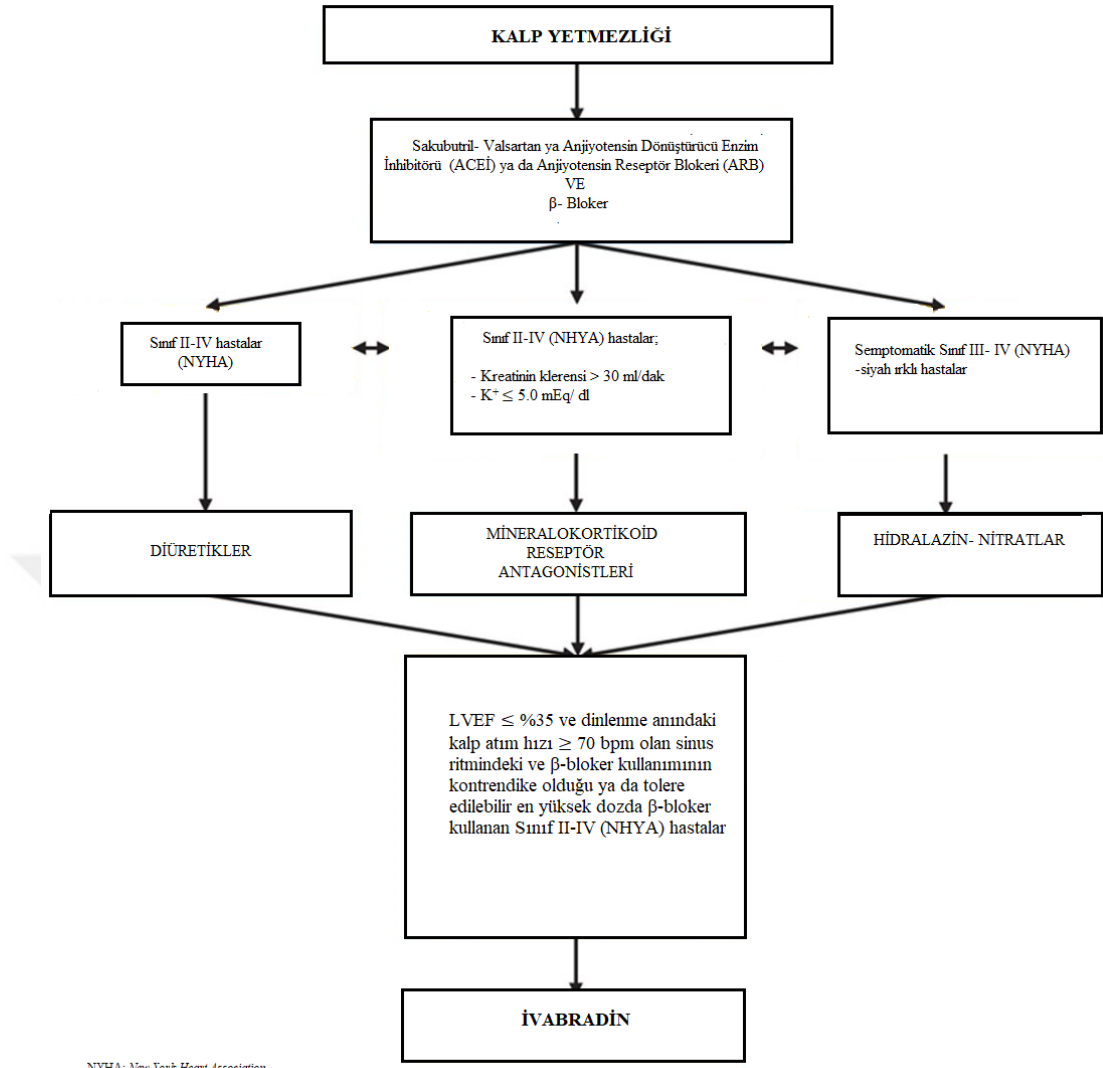
## 1. GİRİŞ

İvabradin, sinüs düğümündeki *funny* ( $I_f$ ,  $f$ ) kanalını selektif olarak inhibe etmekte ve kalbin kontraktilitesini etkilemeksizin kalp atım hızını azaltmaktadır (Bois ve ark., 1996 ve Gardiner ve ark., 1995). Kalp atım hızını azaltmak amacıyla kullanılan diğer ilaçlardan farklı olarak ivabradin, kalp atım hızını ve miyokardın oksijen gereksinimini azaltırken negatif inotropik etki oluşturmamaktadır. Bu özellik ivabradinin anjina pectoris tedavisinde kullanılması için oldukça önemlidir. İvabradin, beta adrenerjik reseptör ( $\beta$ -AR) blokerleri ya da kısaca  $\beta$ -blokerlerin kullanılmasının kontrendike olduğu ya da tolere edilebilir en yüksek dozda  $\beta$ -bloker kullanmakta olan anjina pectoris veya kalp yetmezliği hastalarında sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu (LVEF, *Left Ventricular Ejection Fraction*)  $\% \leq 35$  ve dinlenme durumundaki kalp atım hızı  $\geq 70$  bpm (dakikadaki atım sayısı, *beats per minute*) olan hastalarda kullanılmak üzere 2005 yılında Avrupa İlaç Ajansı (EMA) ve 2006 yılında Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) tarafından; kalp yetmezliği hastalarında kullanılmak üzere 2015 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından onaylanmıştır.

Şekil 1.1. ve Şekil 1.2.'de sırasıyla stabil anjina pectoris ve kalp yetmezliği tedavi algoritmaları ve ivabradinin tedavideki yeri şematik olarak gösterilmiştir.



**Şekil 1.1.** Stabil Anjina Pektoris Tedavi Stratejisi  
 (Kallistratos ve ark., 2017) (<https://www.escardio.org/>, 19/5/2020)



**Şekil 1.2.** Kalp Yetmezliği Tedavi Stratejisi  
(Psotka ve Teerlink, 2016)

SHIFT (*Systolic Heart Failure Treatment with the  $I_f$  Inhibitor Ivabradine Trial*) çalışması New York Kalp Derneği (NYHA, New York Heart Association) sınıflamasına göre sınıf 2-4, LVEF<%35 ve dinlenme anındaki kalp atım hızı>70 bpm olan stabil kalp yetmezliği hastalarında yapılmıştır. Bu çalışmada kalp atım hızındaki artışın ateroskleroz, MI ve vasküler *remodelling* riskini artırdığı bulunmuştur (Urbanek ve ark., 2014). İvabradin tedavisine günde iki kez 5 mg olacak şekilde başlanmış, daha sonra tolere edebilen hastalarda doz günde iki kez 7,5 mg olacak şekilde yükseltilmiştir (Komajda, 2016). Bu çalışmadaki hastaların büyük bir çoğunluğunu β-bloker (%89), anjiyotensin dönüştürü enzim inhibitörü (ACEİ) ve/veya anjiyotensin reseptör blokeri (ARB) (%91), diüretik (%83) ve aldosteron

antagonisti (%60) kullanan hastalar oluşturmaktadır (Fala, 2016). SHIFT çalışmasında ivabradin ile kalp atım hızının azaltılmasının kalp yetmezliği hastalarında primer sonlanım noktaları olan kardiyovasküler ölümleri (%18) ve yetmezliğin kötüleşmesine bağlı hastaneye yatma olgularını azalttığı (%26) bildirilmiştir (Bohm ve ark., 2010 ve Komajda, 2016). Çalışmada kalp yetmezliği hastalarında ivabradin kullanımının oldukça güvenli olduğu bulunmuştur. Hastaların sadece %1'i bradikardi nedeniyle tedaviye devam edememiştir (Komajda, 2013).

BEAUTIFUL (*Morbidity-mortality Evaluation of the I<sub>f</sub> Inhibitor Ivabradine in Patients with Coronary Disease and Left Ventricular Dysfunction*) çalışmasında koroner arter hastalığı olan, LVEF bozulmuş (<% 40) ve dinlenme anındaki kalp atım hızı>70 bpm olan hastalarda ivabradinin etkileri plaseboyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmadaki hastaların büyük bir çoğunluğu NYHA sınıflandırmasına göre sınıf 2 (%61,4) ve sınıf 3 (%23,2)'tür. BEAUTIFUL çalışmasında standart tedaviye ( $\beta$ -bloker, ACEİ ve lipid düşürücü ajanlar) ivabradin eklenmesi koroner arter hastalarında kardiyovasküler ölümleri azaltmıştır (Fox ve ark., 2008a). Primer sonlanım noktaları olan kardiyovasküler ölümler (%24), akut MI ve kalp yetmezliği nedeniyle hastaneye yatma oranları (%16) üzerinde ivabradin istatistiksel olarak önemli bir azalma sağlayamamış, ancak kalp atım hızı>70 bpm olan hastalarda MI hospitalizasyonunu (%30), koroner olay gelişim riskini (%22) azaltmıştır (Urbanek ve ark., 2014).

Çeşitli kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan  $\beta$ -blokerler ve kalsiyum kanal blokerleri, pek çok sistem üzerindeki fizyolojik etkileri nedeniyle kalp atım hızının azaltılmasında ivabradin kadar yüksek seçicilik göstermemektedirler (Speranza ve ark., 2012). Terapötik konsantrasyonda ivabradin diğer kardiyak iyon kanallarını etkilememekte ve kardiyak hücrelerde siklik adenosin monofosfat (cAMP) seviyesini değiştirmemektedir (Tardif ve ark., 2011). İvabradinin en iyi karakterize edilmiş özelliği selektif ve spesifik olarak kalp atım hızını azaltmasıdır. İvabradin,  $\beta$ -blokerlerin aksine izovolumetrik ventriküler relaksasyonda bozulma yapmaz ve negatif inotropik etki oluşturmaz. Bu nedenlerle

sol ventrikül fonksiyonlarını  $\beta$ -blokerlere göre daha iyi korumaktadır. (Ferrari ve Ceconi, 2011).

CARVIVA HF (*Effect of Carvedilol, Ivabradine or Their Combination on Exercise Capacity in Patients with Heart Failure*) çalışmasında kalp yetmezliği hastalarında ivabradin ve üçüncü kuşak bir  $\beta$ -bloker olan karvedilolün egzersiz kapasitesi üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. İvabradinin tek başına veya karvedilol ile birlikte uygulanmasının egzersiz toleransını ve yaşam kalitesini iyileştirdiği gösterilmiştir (Volterrani ve ark., 2011).

INITIATIVE (*International Trial on the Treatment of Angina with Ivabradine versus Atenolol*) çalışmasında anjina hastalarında ivabradin (5-10 mg) ile atenololün artan dozlarındaki (50-100 mg) etkileri 16 hafta boyunca karşılaştırılmıştır (Tardif ve ark., 2005). İvabradin (8,6-10,3 bpm azalma) ile karşılaştırıldığında pik egzersiz testindeki kalp atım hızındaki azalmanın atenolol tedavisi ile daha fazla olduğu (14 bpm) bulunmuştur (Urbanek ve ark., 2014). İvabradinin en az atenolol kadar antianginal ve antiiskemik etkili olduğu gösterilmiştir (Canet ve ark., 2011). Aynı zamanda ivabradin tedavisi ile diyastolün doluş zamanının uzadığı ve koroner vazodilatasyonun koruduğu, atenololden daha fazla koroner akış sağlandığı gözlenmiştir (Colin ve ark., 2004 ve Simon ve ark., 1995).

ASSOCIATE (*Evaluation of the Antianginal Efficacy and Safety of the Association of the If Current Inhibitor Ivabradine with Beta-blocker*) çalışmasında stabil anjina pectoris hastalarında ivabradin ve atenolol karşılaştırılması yapılmıştır. Atenololün tek başına kullanımı ile karşılaştırıldığında ivabradin ve atenolölü kombine kullanan grupta bütün egzersiz tolerans testi parametrelerinin daha iyi olduğu gösterilmiştir (Tardif ve ark., 2009).

### 1.1. Kalp Atım Hızı ve Kardiyovasküler Hastalıklar Arasındaki İlişki

Yapılan epidemiyolojik ve klinik çalışmalarda dinlenme durumundaki kalp atım hızı ile kardiyovasküler mortalite ve morbidite arasında sıkı bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Caetano ve Alves, 2015). Kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde dinlenme anındaki kalp atım hızı oldukça önemli bir risk faktörüdür (Chatzizisis ve Giannoglou, 2011; Perret-Guillaume ve ark., 2009 ve Reil ve ark., 2011). Epidemiyolojik çalışmalarda kalp atım hızı >85 bpm olanlarda kardiyovasküler olay gelişme riskinin ve bütün nedenlere bağlı ölüm oranının daha fazla olduğu bulunmuştur (Dyer ve ark., 1980 ve Kannel ve ark., 1987).

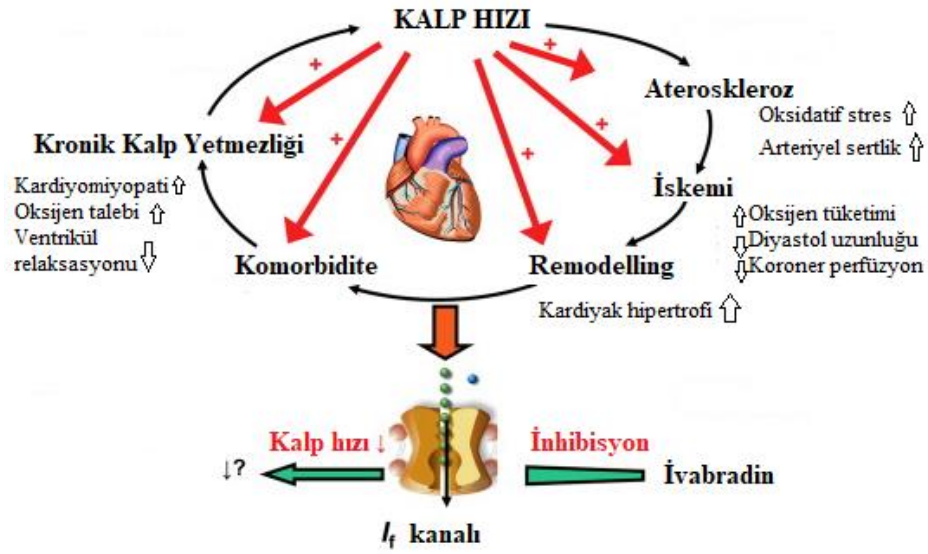
Koroner arter (Eagle ve ark., 2004 ve Fox ve ark., 2008b) ve kalp yetmezliği hastalarında (Bohm ve ark., 2010 ve Flannery ve ark., 2008) kalp atım hızının artması ile total mortalite ve diğer kardiyovasküler hastalıkların gelişimini arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır. Ayrıca kalp atım hızının aterosklerozun patofizyolojisinde ve koroner arter hastalığı gelişiminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Chatzizisis ve Giannoglou, 2011; Perret-Guillaume ve ark., 2009 ve Reil ve ark., 2011).

Kalp atım hızı kardiyovasküler fizyolojinin belirlenmesi açısından da oldukça önemlidir. Kardiyak debi, miyokardiyal oksijen gereksinimi ve tüketimi kalp atım hızı tarafından belirlenmektedir. Üstelik endotel fonksiyon ve vasküler tonüs de kalp atım hızı ile doğrudan ilişkilendirilmektedir (Parakh ve Bhargava, 2011).

Kalp atım hızı miyokardiyal iskeminin patofizyolojisinde de önemli rol oynamaktadır (Andrews ve ark., 1993). Kalp atım hızının düzenlenmesi koroner arter hastalığı ve kalp yetmezliği tedavileri için oldukça önemlidir (Parakh ve Bhargava, 2011).

Şekil 1.3.'te kalp atım hızı ile kardiyovasküler hastalıkların gelişimi arasındaki ilişki gösterilmektedir.

### Kardiyovasküler Hastalıklarda Risk Faktörleri



**Şekil 1.3.** Kalp Atım Hızı ile Kardiyovasküler Olay Gelişimi Arasındaki İlişki (Bohm ve ark., 2015)

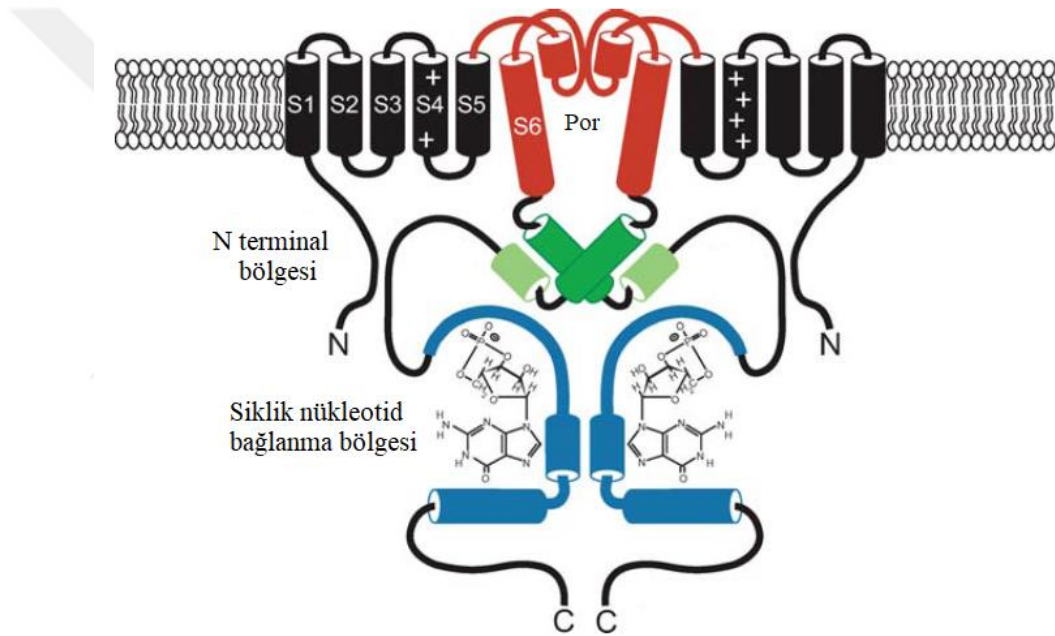
Deneyisel çalışmalarda artan kalp atım hızının vasküler bütünlüğü bozduğu, vasküler oksidatif stres, endotel disfonksiyonu ve ateroskleroz gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (Beere ve ark., 1984; Custodis ve ark., 2008 ve Custodis ve ark., 2010).

Kalp atım hızının artması diyastolün dolma süresini kısaltırken, miyokardın oksijen gereksinimini ve kalbin iş yükünü arttırmaktadır. Kalp atım hızının azalmasıyla miyokardın kan akımı, kontraktilitesi artarak enerji gereksinimi azalmaktadır (Colin ve ark., 2004 ve Mulder ve ark., 2004). Aynı zamanda kalp atım hızının azalması miyokardiyal kan akımını artırarak ventriküler fibrilasyonun önlenmesinde ve mitokondriyal yapının korunmasında yararlı etkilere sahiptir (Vaillant ve ark., 2013).

Kalp atım hızının azalması kalp yetmezliği ve koroner kalp hastalarında total ve kardiyovasküler mortaliteyi azaltmaktadır (Cucherat, 2007 ve Lechat ve ark., 2001). Gelişmiş ülkelerde iskemik kalp hastalıklarının tedavisi için kalp atım hızının azaltılması önemli bir tedavi stratejisidir (Bohm ve ark., 2010 ve Tardif, 2009).

## 1.2. HCN Kanalları

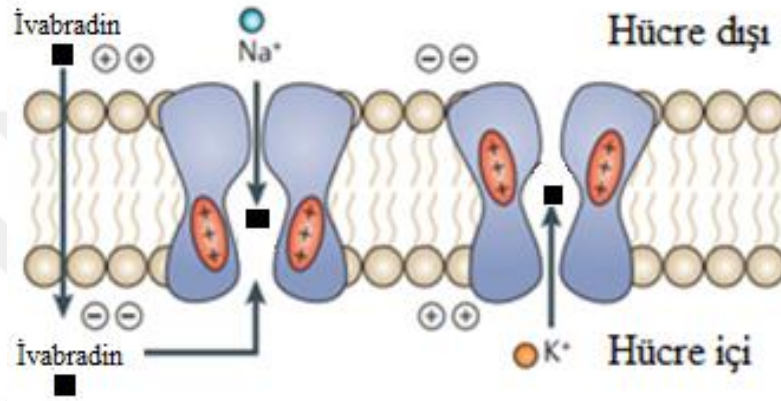
İvabradinin inhibe ettiği kanal, tetramer yapısında ve altı transmembran segmentten oluşan HCN (Hiperpolarizasyon ile Aktive Olan Siklik Nükleotid Kapılı Kanallar, *Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channels*) kanallarıdır. Bu altı segmentin her biri intrasellüler N (Azot) ve C (Karbon) uçlarına sahiptir. Dördüncü segment (S4) primer voltaj sensörü olarak rol oynamaktadır ve pozitif yüklenmektedir. S5 ve S6 segmentleri ise por içeren segmentlerdir (Craven ve Zagotta, 2006). Şekil 1.4.'te HCN kanalının yapısı gösterilmiştir.



**Şekil 1.4.** HCN Kanalının Yapısı  
(Craven ve Zagotta, 2006)

HCN kanalı, yavaş aktivasyon ve deaktivasyon kinetiği gösteren nonselektif sodyum ( $\text{Na}^+$ ) ve potasyum ( $\text{K}^+$ ) kanallarının karışımıdır (Baruscotti ve ark., 2005). HCN kanalı tek değerli katyonlara geçirgen iken iki değerli katyonlara geçirgen değildir (Biel ve ark., 1998). HCN kanalının  $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$  iyonlarına geçirgenlik oranları birbirinden farklıdır ve  $\text{K}^+$  iyonuna geçirgenliği  $\text{Na}^+$  iyonuna geçirgenliğinin 4 katıdır (4:1) (Ludwig ve ark., 1998). HCN kanalı fizyolojik koşullarda  $\text{Na}^+$ 'nın hücre içine;  $\text{K}^+$ 'nın ise hücre dışına geçişini sağlamaktadır (DiFrancesco, 1981).

İvabradin, HCN kanalına hücre içi bağlanma bölgesinden ve kanal açıkken bağlanmaktadır. Membran potansiyeli -20 milivolt (mV)'tan yüksekse, HCN kanalında  $K^+$  hücre dışına çıkmaktadır. Bu dışarı akım, ivabradini kanalın açıklığına doğru ilerleterek bağlanma noktasına sıkıca oturmasına neden olmaktadır. Şekil 1.5.'te HCN kanalının ivabradin ile etkileşimi gösterilmiştir (Diyastolik depolarizasyona katkısı olan öteki akımlar burada gösterilmemiştir) (Postea ve Biel, 2011).



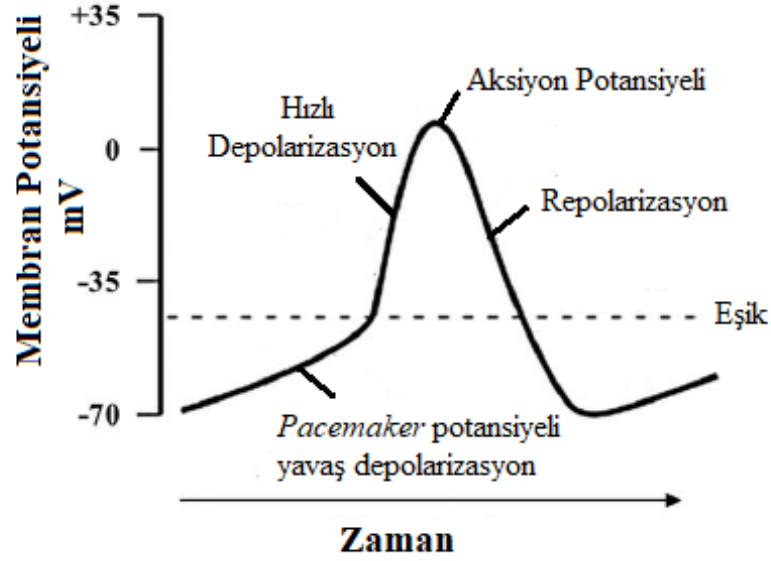
**Şekil 1.5.** HCN Kanalının İvabradin ile Etkileşmesi  
(Postea ve Biel, 2011)

### 1.2.1. HCN Kanallarının Fizyolojisi ve Aktivasyonu

“*Funny*” akım ya da “*pacemaker*” ( $I_f$ ) akımı, memelilerin sinoatriyal düğümlerindeki kardiyak *pacemaker* hücrelerinde bulunmaktadır. *Pacemaker* hücreler kendi kendine uyarı oluşturan odaklardır. Kalbin primer *pacemaker* odağı sinoatriyal düğümüdür ve bu bölge düzenli kardiyak impulsun başlamasından sorumludur (Nerbonne ve Kass, 2005). HCN kanalı, *funny* akımın geçişine olanak vermektedir. Bu akım, aksiyon potansiyelinin Faz 4 aşamasındaki yavaş depolarizasyondan, bir diğer deyişle spontan diyastolik depolarizasyondan sorumlu en önemli akımdır (Parakh ve Bhargava, 2011).

$I_f$  “*funny*” akım olarak tanımlanır çünkü olağandışı özellikleri bulunmaktadır. Bunlardan biri bu kanal aktivasyonunun diğer iyon kanallarında olduğu gibi

fosforilasyon mekanizmasıyla olmamasıdır ve aynı zamanda öteki iyon kanallarından farklı olarak bu kanalın aktivasyonu voltaj bağımlıdır.  $I_f$  kanalı sinoatriyal düğümün yaklaşık -50/-60 mV eşik değerinde hiperpolarize olmasıyla aktive olmaktadır (DiFrancesco, 1993). Şekil 1.6.'da *pacemaker* hücrelerde membran potansiyelinin oluşumu gösterilmektedir.

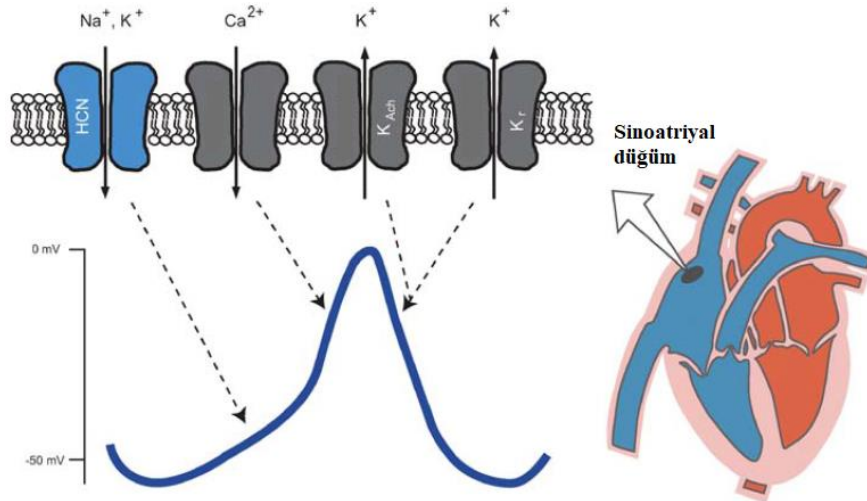


**Şekil 1.6.** *Pacemaker* Hücrelerde Membran Potansiyeli  
(Singh ve ark., 2016)

HCN kanalının aktivasyonu hem membran hiperpolarizasyonu ile hem de kanala siklik nükleotid bağlanması ile gerçekleşmektedir (Craven ve Zagotta, 2006). HCN kanalının voltaja bağımlı olarak açılması, yani aktive olması direkt olarak cAMP ile düzenlenmektedir (Biel ve ark., 2002). Kanala cAMP bağlanması HCN proteininde konformasyonel bir değişikliğe neden olmakta ve kanalın hiperpolarizasyon sırasında açık kalma olasılığını artırmaktadır. Sempatik stimülasyon sonucu hücre içi cAMP konsantrasyonu artmaktadır ve cAMP, kanal aktivasyonunu daha pozitif (depolarize) olacak şekilde değiştirerek diyastolik depolarizasyonun hızını artırmaktadır. Böylece cAMP hem kanalın açık kalma hızını hem de maksimum akım seviyesini yükselterek kalp atım hızını artırmaktadır (Parakh ve Bhargava, 2011). Kolinerjik stimülasyon ise cAMP seviyesini azalttığı için kanalı aktive edemez ve kalp atım hızı azalmaktadır (DiFrancesco ve Tortora, 1991).

HCN kanalı sinir sisteminde de *pacemaker* akımının oluşmasına aracılık etmektedir. Sinir sisteminde bu kanalın açılma kinetiği kalptekinden daha hızlı olmaktadır. Çünkü nöronal aksiyon potansiyeli kardiyak aksiyon potansiyelinden daha hızlıdır (Ono ve ark., 2003 ve Stein ve ark., 2005). Kalpte olduğu gibi sinir sisteminde de cAMP, HCN kanalının aktivasyon kinetiğini ve maksimum akım seviyesini artırmaktadır. Kalptekine benzer şekilde nörotransmitterler cAMP seviyesini değiştirerek bu kanalın aktivasyon kinetiğini etkilemektedir (Banks ve ark., 1993; Cuttle ve ark., 2001; Ingram ve Williams, 1996 ve Saitow ve Konishi, 2000).

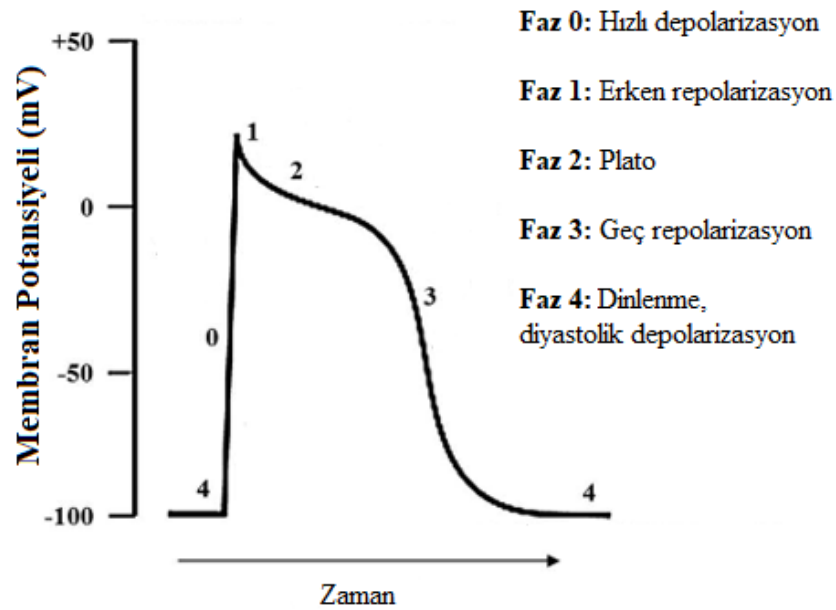
HCN kanalı aktive olduğu zaman hücre içine  $\text{Na}^+$  iyonu girişiyle bir akım oluşmakta ve membran potansiyeli daha depolarize olarak voltaj duyarlı  $\text{Ca}^{2+}$  kanallarının aktivasyonuna aracılık etmektedir. Bu depolarizasyon HCN kanalını deaktif etmektedir. Daha sonra depolarizasyona bağlı olarak  $\text{K}^+$  kanalları açılmakta ve hücre dışına  $\text{K}^+$  çıkışı gerçekleşerek membran potansiyeli azalmaktadır. Bu durum bir diğer aksiyon potansiyelinin oluşmasını sağlamaktadır (Altomare ve ark., 2003 ve DiFrancesco, 1991). Şekil 1.7.'de sinoatriyal düğümde HCN kanalının aktive olması, *pacemaker* potansiyelinin oluşumuna katkı sağlayan iyon kanallarının aktivasyonu ve membran potansiyelindeki değişim gösterilmektedir.



**Şekil 1.7.** Sinoatriyal Düğümde *Pacemaker* Potansiyelinin Oluşmasına Katkı Sağlayan İyon Kanalları ve Membran Potansiyelindeki Değişim (Craven ve Zagotta, 2006).

Kardiyak miyositlerin normal aksiyon potansiyeli negatif (-85-90 mV) olup yatık düz dinlenme fazındadır (Faz 4). Membran potansiyeli her atım sırasında yaklaşık +20 mV değerine çıkmaktadır. Hızlı depolarizasyon fazında (Faz 0) miyokardda hücrenin  $\text{Na}^+$  iyonuna karşı geçirgenliği artmaktadır ve böylece hücre içi potansiyeli ani bir şekilde pozitif voltaj değerine yükselmektedir. Erken repolarizasyon fazı olan Faz 1'de hücrenin  $\text{K}^+$  iyonuna karşı geçirgenliği artarak hücre dışına  $\text{K}^+$  çıkışı olmaktadır. Aynı zamanda bu fazda  $\text{Na}^+$  kanalları kapanmaktadır. Plato fazı olan Faz 2 aşamasında yavaş  $\text{Ca}^{+2}$  kanalları açılarak hücre içine  $\text{Ca}^{+2}$  iyonunun girişi olmaktadır. Geç repolarizasyon aşaması olan Faz 3'te dinlenme potansiyeline dönüş olmaktadır ve  $\text{K}^+$  kanalları açılarak hücre dışına  $\text{K}^+$  çıkışı gerçekleşmektedir. Aynı zamanda bu fazda hücre içinde  $\text{Na}^+$  iyonları birikmektedir. Dinlenme fazı ya da diastolik depolarizasyon fazı olarak bilinen Faz 4'te  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{+2}$  iyonlarının hücre içine yavaş bir şekilde sızması söz konusudur (Shih, 1994).

Şekil 1.8.'de kardiyak miyositlerde aksiyon potansiyelinin oluşumu ve iletimi gösterilmektedir.



**Şekil 1.8.** Kardiyak Miyositlerde Aksiyon Potansiyeli (Jung, 2012)

### 1.2.2. HCN Kanalıının İzofomları ve Bu İzofomların Lokalizasyonu

HCN kanalıının cAMP'ye duyarlılıkların, voltaj bağımlı aktivasyonlarının ve dağılımlarının farklılıklarına göre sınıflandırılmış dört farklı izofomu bulunmaktadır (HCN1-4)(Santoro ve ark., 2000). Genomik sınıflandırmaya göre ayrılmış HCN izofomlarının aktivasyon hızlarına göre sıralaması: HCN1> HCN2> HCN3> HCN4 şeklindedir (Accili ve ark., 2002; Altomare ve ark., 2001; Moosmang ve ark., 2001; Stieber ve ark., 2005 ve Stieber ve ark., 2003). HCN2 ve HCN4 izofomlarının cAMP'ye duyarlılığı HCN1 ve HCN3 izofomlarından daha fazladır. Yapılan bazı çalışmalarda HCN kanalıının cAMP'ye duyarlılığının C lifli nöronlarda A lifli nöronlara göre daha fazla bulunmuştur. HCN1 izofomu sadece A lifli nöronlarda bulunur ve görece cAMP'ye duyarlılığı daha azdır (Doan ve ark., 2004 ve Kaupp ve Seifert, 2001). HCN2 ve HCN4 izofomları ise hem A lifli hem de C lifli nöronlarda bulunmaktadır. İzofomların lokalizasyonunun farklı olması farklı roller üstlenmelerine neden olmaktadır (Doan ve ark., 2004). Örneğin; A lifli nöronlarda hızlı aktivasyon, C lifli nöronlarda ise yavaş aktivasyon hızı gözlenmektedir (Doan ve Kunze, 1999).

HCN izofomları sinoatriyal düğüm dışında atriyoventriküler düğüm ve purkinje lifleri gibi diğer *pacemaker* dokularda da bulunmaktadır (Dobrzynski ve ark., 2003; Munk ve ark., 1996 ve Shi ve ark., 1999). Bu bölgelerdeki  $I_f$  kanallarının aktivasyon kinetiği sinoatriyal düğümdekinden farklıdır ve bu bölgelerdeki aktivasyon daha depolarize voltajda gerçekleşmektedir (Baruscotti ve ark., 2005).

HCN izofomları kalpte, retinada ve nöronal dokularda lokalize olmuştur. Fetal ve neonatal kalpte HCN izofomlarının ekspresyonu fazlayken yetişkin miyokardiyumunun çoğu bölgesinde belirgin bir şekilde azalmıştır (Roubille ve Tadif, 2013). HCN kanalıının bilinen dört izofomundan HCN4'ün kalpte sinüs ve atriyoventriküler düğüm hücrelerinde yoğun olarak bulunduğu bilinmektedir. HCN3 izofomu ise bu bölgelerde minimum bir şekilde eksprese edilmektedir (Murray, 2013). Çizelge 1.1.'de HCN izofomlarının lokalizasyonu, cAMP duyarlılığı,

aktivasyon hızı ve voltaj değeri gösterilmektedir (Moosmang ve ark., 1999 ve Santoro ve ark., 2000).

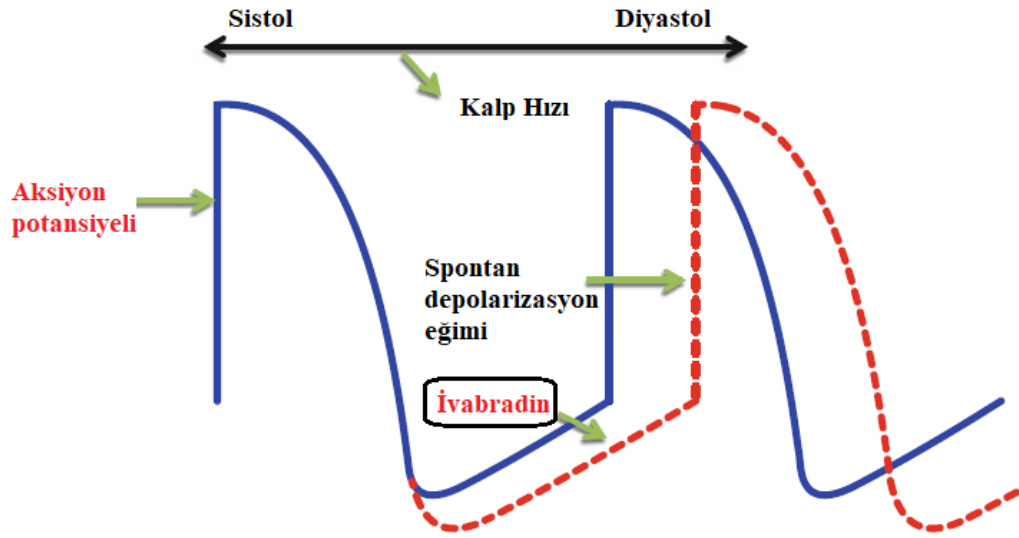
**Çizelge 1.1.** HCN İzofomlarının Lokalizasyonu, cAMP Duyarlılığı, Aktivasyon Hızı ve Voltaj Değeri  
(Moosmang ve ark., 1999; Santoro ve ark., 2000 ve Yavuz ve Onat, 2018)

| İzofom | Lokalizasyonu                                                                                                                                 | cAMP duyarlılığı | Aktivasyon hızı   | Aktivasyon voltajı |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------|--------------------|
| HCN1   | Korteks, hipokampus, serebellum, talamus, arka kök gangliyon, sinoatriyal düğüm, atriyoventriküler düğüm, Purkinje lifleri, fotoreseptörler   | Düşük            | Hızlı (30-300 ms) | -70 mV             |
| HCN2   | Talamus, beyin kök hücresi, korteks, hipokampus, serebellum, sinoatriyal düğüm, atriyoventriküler düğüm, arka kök gangliyonu, bazal gangliyon | Yüksek           | Orta (200-400 ms) | -95 mV             |
| HCN3   | Hipotalamus, koku siniri, kalp kası, karaciğer, akciğer, böbrek                                                                               | -                | Yavaş (400 ms-s)  | (-77)-(-95) mV     |
| HCN4   | Talamus, bazal gangliyon, sinoatriyal düğüm, atriyoventriküler düğüm, Purkinje lifleri, testis, iskelet kası, akciğer                         | Yüksek           | Yavaş (400 ms-s)  | -100 mV            |

### 1.3. İvabradinin Fizyolojik ve Pleiotropik Kardiyovasküler Etkileri

*Pacemaker* kanallarını bloke eden pek çok molekül geliştirilmiştir. Bu moleküller; silobradin (Faz 1), alinidin (ST567), zatebradin (Faz 3), ivabradin ve ZD7288'dir. Bu moleküllerden sadece ivabradin klinik faz aşamalarından başarıyla geçebilmiştir ve kullanımdaki tek  $I_f$  kanal blokeridir (Van Bogaert ve Pittoors, 2003 ve Vilaine, 2006).

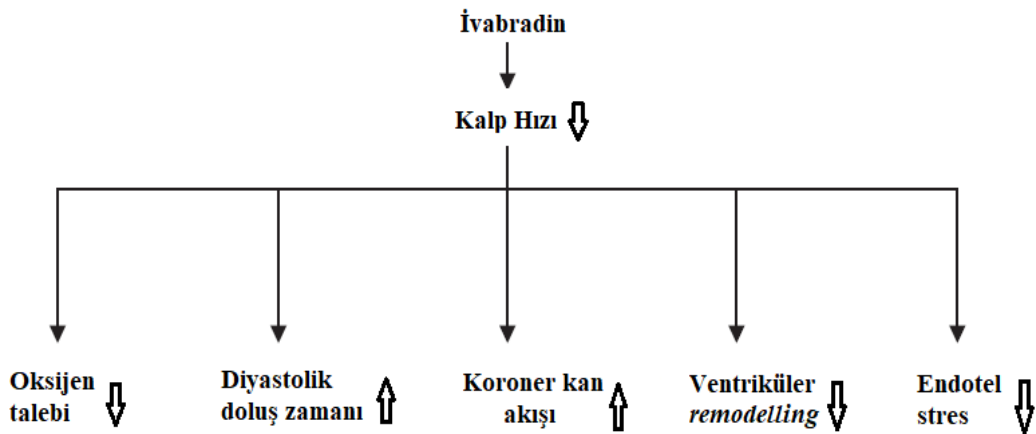
İvabradinin bilinen tek etki mekanizması  $I_f$  kanalını selektif ve spesifik olarak bloke ederek sinoatriyal düğümdeki diastolik depolarizasyon fazının eğimini azaltarak ardışık aksiyon potansiyelleri arasındaki *interval* süresini uzatmaktadır. Böylece kalp atım hızını azaltmaktadır (Şekil 1.9) (Franke ve ark., 2011).



**Şekil 1.9.** İvabradinin Etki Mekanizması  
(Komajda, 2016)

İvabradin etkisini doza ve voltaja bağımlı olarak gerçekleştirmektedir. İvabradinin etkinliği kanalın açık olmasına bağlıdır ve kanalın açılıp kapanma hızı arttıkça (kalp atım hızı ne kadar yüksekse)  $I_f$  kanalını daha kuvvetli inhibe etmektedir (kullanıma bağlı etki) (Scicchitano ve ark., 2012). Kalp atım hızının yavaş olduğu durumlarda ise  $I_f$  kanalının inhibisyonu daha zayıf olmaktadır (Bucchi ve ark., 2002).

Şekil 1.10.'da ivabradinin kalp atım hızında oluşturduğu azalmaya bağlı olarak gerçekleştirdiği fizyolojik etkileri şematize edilmiştir.



**Şekil 1.10.** İvabradinin Fizyolojik Etkileri  
(Parakh ve Bhargava, 2011)

İvabradinin asıl etki mekanizmasından bağımsız olarak gösterdiği yararlı etkilerini (pleiotropik etkiler) gösteren pek çok çalışma bulunmasına rağmen bu etkilerinin mekanizması hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Heusch ve ark.'larının (2008) yaptığı deneysel bir çalışmada anestezi altındaki domuzlara 90 dakika (dak) hipoperfüzyon/reperfüzyon uygulanmış ve hipoperfüzyondan önce, iskemi sırasında ve hatta reperfüzyonun hemen öncesinde ivabradin uygulanmasının miyokard hasarını (infarkt alanı ve *area at risk* değerlendirmesi ile) azalttığı bildirilmiştir. Bunun yanı sıra, hipoperfüzyon sırasında uygulanan ivabradinin koroner kan akımını artırdığı gösterilmiştir (Heusch ve ark., 2008). İvabradin tedavisi ile azalan atriyal atım hızı,  *pacing* ile tedavi öncesine yükseltildiğinde bu etkiler azalmış olsa da infarkt alanındaki azalma kısmen korunmaktadır. Bu veri, ivabradinin kardiyoprotektif etkisinin yalnızca kalp atım hızını azaltmasından kaynaklanmadığını düşündürmektedir (Heusch, 2008).

Başka bir çalışmada, anestezi öncesinde tek doz ivabradin ya da plasebo verilmiş farelere koroner oklüzyon-reperfüzyon uygulanmıştır. İvabradin tedavili farelerde kalp atım hızı  *pacing* ile plasebo grubunun değerlerine yükseltildiğinde bile ivabradinin infarkt alanını azaltıcı etkisinin korunduğu görülmüştür. Aynı çalışmada, fare ventrikülünden izole edilmiş kardiyomiyositlere iskemi-reperfüzyon simülasyonu (sırasıyla hipoksik ve normoksik kültür ortamı ile) yapılmış ve ivabradin uygulamasının kardiyomiyosit canlılığını koruduğu, buna hem intrasellüler hem de ekstrasellüler reaktif oksijen türleri (ROS) azalmasının eşlik ettiği bildirilmiştir (Kleinbongard ve ark., 2015).

Yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda ivabradinin antiinflamatuvar etkisinin olduğu gösterilmiştir. Walcher ve ark. (2010) tarafından ivabradinin CD4 (farklılaşma kümesi 4, *Cluster of Differentiation 4*) pozitif lenfosit migrasyonunu kemokinle indüklenen fosfoinositid-3 kinaz (PI3K, *Phosphoinositide 3-Kinase*)/protein kinaz B (Akt) aktivitesini inhibe ederek azalttığı bulunmuştur (Walcher ve ark., 2010).

Drouin ve ark. (2008) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada dislipidemik farelerin (insan ApoB-100 geni taşıyan transjenik model) içme sularına ivabradin veya bir  $\beta$ -bloker olan metoprolol eklenerek fareler üç ay süreyle tedavi edilmiş, renal ve serebral damarlarda oluşan endotel disfonksiyonunun (bozulmuş asetilkolin gevşemelerinin) ivabradin tedavisi ile engellendiği bildirilmiştir (Drouin ve ark., 2008).

ApoE<sup>-/-</sup> (Apolipoprotein E Eksik, hiperkolesterolemik, dislipidemik) farelerin yemlerine katılarak verilen ivabradin endotelde oluşan disfonksiyonu ve artmış aterosklerotik plak büyüklüğünü belirgin olarak azaltmıştır. Bu çalışmada ivabradin endotel hücre proliferasyonunu, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve vasküler proliferasyona işaret eden proteinlerin miktarını değiştirmeksizin indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz aktivitesini, aortada süperoksit üretimini ve lipid peroksidasyonunu azaltmıştır. İvabradinin antiaterosklerotik etkilerinin vasküler oksidatif stresin azalmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Custodis ve ark., 2008).

İvabradin tedavisinin ApoE<sup>-/-</sup> farelerde bozulmuş olan aortik endotelial gevşemeleri düzelttiği, bu etkinin kalp atım sayısını azaltan bir diğer ajan olan metoprololle gerçekleşmediği gösterilmiştir (Schirmer ve ark., 2012).

ApoE<sup>-/-</sup> farelerde bozulmuş olan endotel fonksiyonunun 20 haftalık ivabradin tedavisi ile düzeldiği ve buna ROS azalmasının eşlik ettiği gösterilmiştir. Araştırmacılar ivabradin ile tedavi edilen ApoE<sup>-/-</sup> farelerde düşük olan endotelial ROS sinyalinin L-NAME (N<sup>ω</sup>-Nitro-L-Arjinin Metil Ester Hidroklorür) inkübasyonu sonrasında yükseldiğini gözlemişler ve bunun da ivabradinin eNOS ile kenetlenmeyi koruyucu etkinliğinden kaynaklandığını düşünmüşlerdir. Aynı çalışmada anjiyotensin-II ile oluşturulmuş endotel disfonksiyon modelinde ivabradinin endotelial fonksiyonu koruyucu etkinlik göstermediği gözlenmiştir. Araştırmacılar bu farklılığın model ve tedavi farkından kaynaklandığını bildirmişlerdir (Kroller-Schon ve ark., 2011).

İvabradin iyi tolere edilebilen bir ilaçtır (Tardif, 2007). En sık görülen yan etkisi fosfen benzeri görme rahatsızlığıdır. Bu rahatsızlıkta görme alanında ışıklı alanlar (kısa süreli artmış parlaklık, genellikle ani ışık yoğunluğundaki değişimlere bağlı oluşan) oluşmaktadır (Speranza ve ark., 2012). Fosfen insidansı %10-15 arasındadır (Parakh ve Bhargava, 2011). Semptomlar doza bağlıdır ve ilacın kullanımının kesilmesinden sonra ortadan kalkmaktadır. İvabradin bu etkisini retinada bulunan ve yapısal olarak  $I_f$  kanalına çok benzeyen  $I_h$  kanalını inhibe ederek göstermektedir (Demontis ve ark., 2002). İvabradinin bradikardi (<55 bpm) oluşturma insidansı %3,2'dir. Hastaların %0,3'ünden daha azında ciddi bradikardi (<40 bpm) gözlenmektedir. İvabradinin diğer yan etkileri ise baş ağrısı, baş dönmesi, ventriküler ekstrasistol, bulantı, diyare, baş dönmesi, kas krampı, hiperürisemi, eozinofili ve serum kreatinin artışıdır (Parakh ve Bhargava, 2011). İvabradin hidrofilik bir molekül olduğu için kan beyin bariyerini geçememektedir ve böylece santral sinir sistemi nöronlarında bulunan  $I_h$  kanalını etkilememektedir (Riccioni, 2012).

#### **1.4. Diyabet ve Kardiyovasküler Komplikasyonları**

Diabetes mellitus (diyabet) pankreastan insülin salıverilmesindeki eksikliğe ya da dokuların insüline duyarlılığının azalmasına bağlı olarak gelişen metabolik bir hastalıktır (Atkinson ve ark., 2014). Diyabet, ciddi bir halk sağlığı sorunudur (Li, 2013).

Diyabette insülin rezistansı, hiperglisemi ve insülin eksikliği olmaktadır. Diyabete bağlı olarak çeşitli kardiyovasküler disfonksiyonlar oluşmaktadır. Bunlardan bazıları endotel disfonksiyonu, ateroskleroz gelişimi, zayıf kollateral vasküler oluşum ya da anjiogenezis, kardiyomiyopati ve fibrozis gelişimidir (Kitada ve ark., 2010).

#### 1.4.1. Diyabet ve Vasküler Fonksiyon Bozukluğu Arasındaki İlişki

Diyabetik vasküler komplikasyonlar büyük arterleri ve kapilleri etkilemesine göre mikro ve makrovasküler komplikasyonlar olarak sınıflandırılmaktadır. Bu durum patogenezin anlaşılması açısından oldukça önemlidir (Rask-Madsen ve King, 2013).

Vasküler düz kas ve kan arasında mekanik bir bariyer olduğu düşünülen endotel tabakasının fiziksel ve kimyasal uyaranlara cevap olarak vasküler tonus, adezyon, proliferasyon ve inflamasyon gibi süreçleri düzenleyen çok sayıda faktör ürettiği bilinmektedir. Vasküler endotelyum bu nedenle kompleks bir endokrin ve parakrin organ olarak kabul edilmektedir (Furchgott ve Zawadzki, 1980; Rajendran ve ark., 2013 ve Xu ve Zou, 2009).

Endotel hücrelerden salıverilen en önemli vazodilatör madde olan nitrik oksit (NO), eNOS aracılığıyla L-arjininden sentezlenmekte ve vasküler düz kasa difüze olarak guanilat siklaz enzimini aktive etmektedir. Bunun sonucu olarak artan siklik guanozin monofosfat (cGMP), vazodilatasyona neden olmaktadır (Forstermann ve Munzel, 2006). Vazodilatasyona endotel hücreler tarafından salıverilen endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF) ve prostasiklin katkıda bulunurken (Halcox ve ark., 2001 ve Moncada ve ark., 1977) yine bu hücrelerden salıverilen endotelin ve bazı prostanoidler ile endotel yüzeyinde gerçekleşen anjiyotensin II oluşumu ise vazokonstriksiyona aracılık etmektedirler (Kinlay ve ark., 2001 ve Saye ve ark., 1984). NO; inflamasyon, proliferasyon ve trombozisi önlemede primer rolü üstlenmekte ve bunu nükleer faktör-kappa B (NFκB) gibi transkripsiyon faktörleri, hücre siklusu ve doku faktörü oluşumunu kontrol eden proteinlerin biyolojik aktivitesini düzenleyerek gerçekleştirmektedir (Stamler ve ark., 2001). Uzun süre diyabet gibi kardiyovasküler risk faktörlerine maruz kalındığında endotel tabakası disfonksiyonel olmakla kalmayıp endotel hücreler bütünlüklerini kaybetmekte ve hatta koparak dolaşıma geçmektedirler (Woywodt ve ark., 2002). Endotel fonksiyonu gerek in vivo gerekse dolaşımdaki bazı belirteçlerin ölçümü yoluyla belirlenebilmektedir. Bu amaçla, e-selektin, vasküler adhezyon molekülü-1 (VCAM-

1, *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), p-selektin ve hücre içi adhezyon molekülü-1 (ICAM-1, *Intercellular Adhesion Molecule-1*) gibi moleküllerin miktar tayinleri immünolojik yöntemlerle yapılmaktadır (Ridker ve ark., 2004).

Diyabette hem koroner hem de periferik arterlerde endotel disfonksiyonun bir göstergesi olarak vazodilatör yanıtların azaldığı bilinmektedir (Johnstone ve ark., 1993; McVeigh ve ark., 1992; Nicolls ve ark., 2007; Steinberg ve ark., 1996 ve Williams ve ark., 1996). Diyabette insülin aracılı eNOS fosforilasyonunun inhibe olması sonucu NO üretimi azalmaktadır (Huang, 2009).

Bozulan vazodilatör yanıtlara ek olarak diyabette yukarıda sözü edilen endotel kaynaklı adhezyon molekülleri ile plazminojen aktivatör inhibitör-1'in dolaşımdaki miktarları artmaktadır (Keaney ve ark., 2004; Meigs ve ark., 2004 ve Meigs ve ark., 2000). Endotel disfonksiyonun en önemli nedenleri arasında eNOS fonksiyonunun bozulmasına neden olan PI3K/Akt gibi sinyalizasyon yolağı bozuklukları (Kim ve ark., 2006; Montagnani ve ark., 2002 ve Wheatcroft ve ark., 2003) ve artan oksidatif stres sayılmaktadır (Gao ve Mann, 2009; San Martin ve ark., 2007 ve Tesfamariam ve Cohen, 1992).

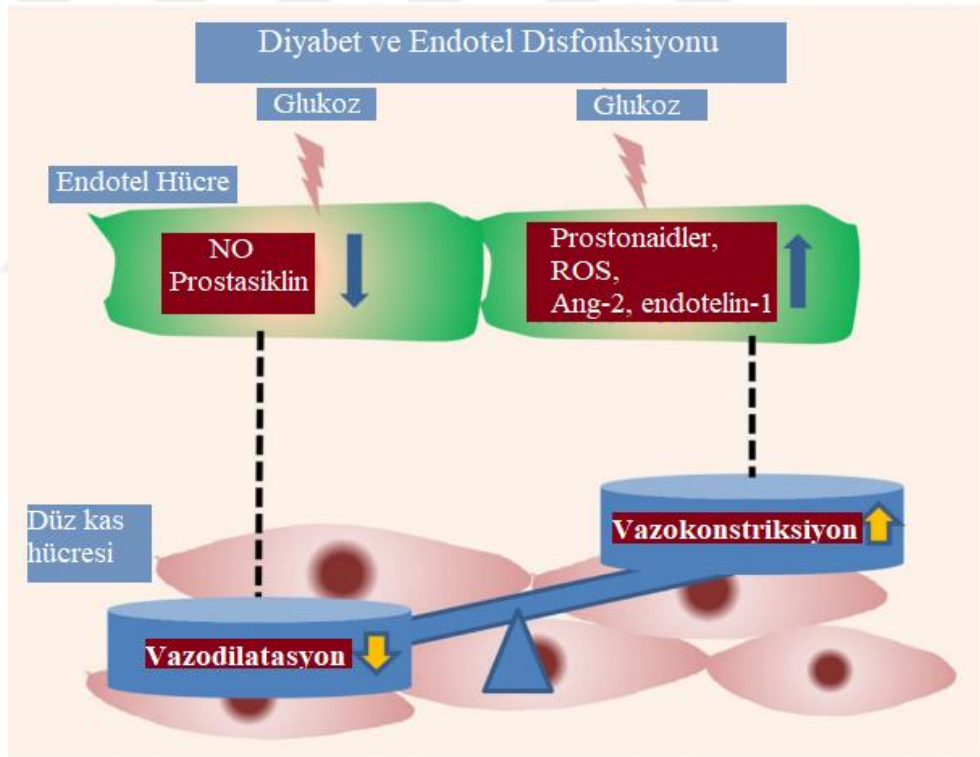
İnsülinin fizyolojik seviyeleri endotel hücrelerde insülin reseptör substratı (IRS)/PI3K/Akt yolağı aracılığı ile VCAM-1 ekspresyonunu azaltmakta ve antiaterojenik etki göstermektedir. Bu nedenle diyabet ya da insülin rezistansı durumunda insülin seviyesinin yükseltilmesi ateroskleroz gelişimini, kollateral damar oluşumunu ve kardiyomiopatiyi azaltmaktadır (King ve ark., 2016).

Nodoz gangliyonlarda lokalize olmuş aortik baroreseptör nöronlar, arteriyel barorefleksin primer afferent bileşenidir. Arteriyel barorefleks normalde kan basıncını ve kalp atımını düzenlemektedir. Arteriyel barorefleks kan basıncındaki büyük dalgalanmaları önleyerek otonom sinir sisteminin hem sempatik hem de parasempatik yanıtlarında rol oynamaktadır. Streptozotosin (STZ) ile indüklenmiş Tip 1 diyabet modelinde nöronlardaki fonksiyonel değişiklikler nedeniyle arteriyel

barorefleks disfonksiyonu gelişmektedir ve bu durum hastalarının mortalitesini arttırmaktadır (Li, 2013).

Burada yalnızca bir kısmı özetlenen pek çok klinik ve deneysel çalışmada, antioksidanlar, anjiyotensin inhibitörleri ve antiinflammatuar ilaçların diyabetik kardiyovasküler yararlı etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda, endotel disfonksiyonunun düzeltilmesini hedefleyen yaklaşımlar da tedavide önemli kullanım alanı bulmaktadır.

Şekil 1.11.'de diyabet ve vasküler fonkiyon bozukluğu arasındaki ilişki gösterilmiştir.

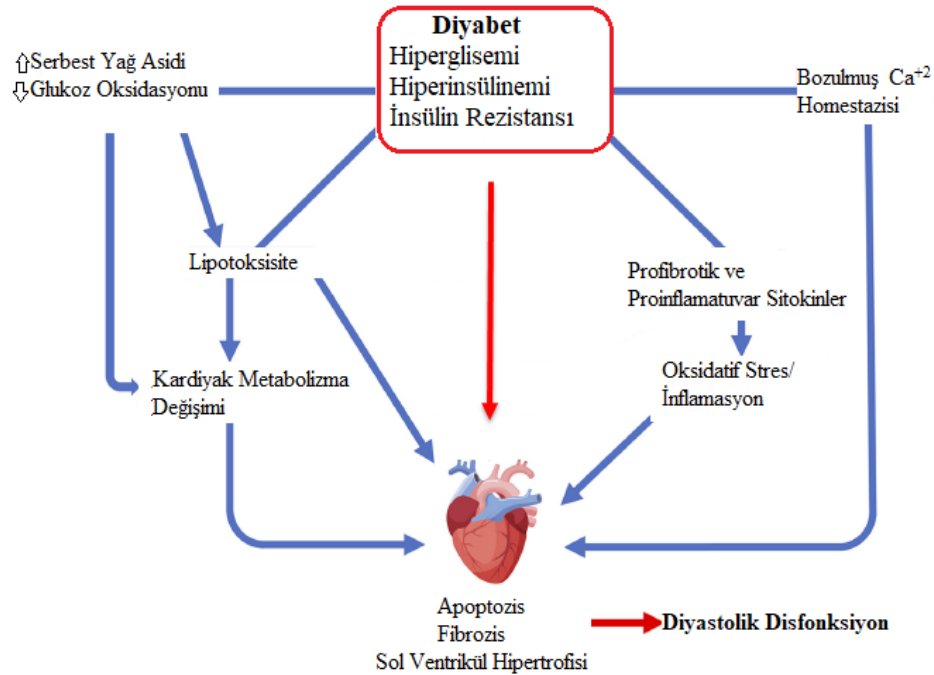


**Şekil 1.11.** Diyabet ve Vasküler Fonksiyon Bozuklukları  
(Knapp ve ark., 2019)

#### 1.4.2. Diyabet ve Kardiyak Fonksiyon Bozukluğu Arasındaki İlişki

Kardiyovasküler komplikasyonlar diyabetin en sık rastlanan ve zarar veren sonuçlarıdır. Diyabetik hastalarda görülen morbidite ve mortalitenin başlıca nedeni diyabetik kardiyovasküler komplikasyonlardır (Altabas, 2015 ve Riddle, 2011). Diyabetik kardiyomiyopati; sistolik, diyastolik ve miyokardiyal fonksiyon bozuklukları ile karakterizedir. Koronar arter hastalıkları, hipertansiyon ve diğer kardiyovasküler hastalıklardan bağımsız olarak da gözlenmektedir (Ma ve ark., 2017; Pan ve ark., 2014 ve Qin ve ark., 2016).

Diyabetik kardiyomiyopati gelişiminin mekanizması oldukça komplekstir ve sebep olan pek çok moleküler mekanizma bulunmaktadır (Bugger ve Abel, 2014 ve Zhang ve ark., 2012). Diyabetik kardiyomiyopatinin erken evreleri diyastolik fonksiyon bozukluğu ile karakterizedir. Kardiyomiyosit hipertrofisi, miyokardiyal fibrozis, apoptozis ve kardiyak *remodelling* gelişimi de gözlenmektedir (Huynh ve ark., 2014). Şekil 1.12.'de diyabetik kardiyomiyopati gelişiminin mekanizması gösterilmektedir.



**Şekil 1.12.** Diyabet ve Kardiyak Fonksiyon Bozuklukları (Borghetti ve ark., 2018)

Kardiyak hipertrofi belirteci olan atriyal natriüretik peptid (ANP) ekspresyonu diyabetik fare kalbinde artmaktadır. Araştırmacılar diyabette miyokardiyal fibrozis ve apoptozis ile kollajen birikimi olduğunu gözlemlemişlerdir (Liang ve ark., 2015).

Başka bir çalışmada STZ-diyabetik hayvanlarda sağ atrium ve izole kalbin spontan *pacemaker* hızının azaldığı, sinoatriyal düğümdeki aksiyon potansiyeli zamanının uzadığı bulunmuştur. Bu durum sinoatriyal düğümün fonksiyonlarını azaltmıştır (Howarth ve ark., 2007 ve Kofo-Abayomi ve Lucas, 1988). Diyabetik sinoatriyal düğümdeki elektriksel *remodelling*'e yol açan moleküler mekanizma hala tam olarak bilinmemektedir (Huang ve ark., 2016).

### 1.5. Diyabet ve İvabradin Çalışmaları

Stabil anjina pectoris hastalarının önemli bir alt grubunu diyabetik hastalar oluşturmaktadır. Bu nedenle, diyabetik hasta grubunda ivabradinin kardiyovasküler pleiotropik etkilerinin değerlendirilmesi son derece önemlidir.

Diyabetik farelerde ivabradin (10 mg/kg/gün, 3 ay) ile ekokardiyografik bulguların düzeldiği, buna matriks metalloproteinaz-2 miktar ve aktivitesinde azalmanın eşlik ettiği bildirilmiştir. Bu çalışmada ivabradinin miyokardiyal apoptozisi ve kardiyak disfonksiyonları azalttığı bulunmuştur (Chen ve ark., 2014).

Reil ve ark.'nın (2013) çalışmasında Tip II diyabet modeli olan db/db fareler ve non-diyabetik heterozigot kontrollerinin (db/+) içme sularına ivabradin (20-50 mg/kg/gün, 4 hafta) eklenmiştir. Kalbin kontraktıl fonksiyonuna ilişkin bazı parametreler ile damarların ivabradin tedavisinden nasıl etkilendiği incelenmiştir. Diyabetik grupta fibrozisin arttığı, bu durumun ivabradin ile düzeldiği bildirilmiştir. db/db farelerde bozulmuş ventrikül fonksiyonunun ivabradin tedavisi ile kısmen düzeldiği bulunmuştur. Histolojik incelemelerde ise kontrole kıyasla db/db grupta aortadaki kollajen miktarının yaklaşık üç katına ve dihidroetidyum (DHE) miktarına göre belirlenmiş oksidatif stresin bir buçuk katına yükseldiği; buna karşın 4,5-

diaminoflorosein diasetat (DAF-2DA) miktarına göre belirlenmiş olan NO miktarının azaldığı gösterilmiştir. Bu değerler, ivabradin tedavili db/db grupta kontrollerle aynı düzeylerde bulunmuştur. Bu veriler ışığında araştırmacılar db/db modelde ivabradin tedavisinin vasküler sertliği, sol ventrikül kontraktilesini ve diyastolik fonksiyonu düzelttiği sonucuna ulaşmışlardır (Reil ve ark., 2013). Bu çalışma, Tip I diyabet modelinde oluşacak endotel hasarının da ivabradin ile engellenebileceğine temel oluşturmaktadır. Ne var ki, db/db fare modeli, metabolik belirtiler açısından insülin-bağımlı olmayan Tip II diyabet modeli olarak kabul edilse de bu modele artmış kalp atım hızı eşlik etmektedir. Bu tez çalışmasında tasarlanan Tip I diyabet modelinde ivabradinin kardiyovasküler etkileri farklılık gösterebilecektir.

Kalp yetmezliği progresyonunu yansıtan esansiyel nörohormonların en önemlileri noradrenalin ve beyin natriüretik peptid (BNP)'dir. Cao ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada STZ-diyabetik ve diyabetik olmayan sıçanlarda kronik iskemik kalp yetmezliğinden sonra ivabradin enjeksiyonunun (i.p, intraperitoneal) kardiyak fonksiyonlar, plazma noradrenalin ve BNP-45 seviyesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Kronik kalp yetmezliğinden sonra diyabetik ve diyabetik olmayan sıçanlarda artmış olan noradrenalin ve BNP-45 seviyelerinin ivabradin enjeksiyonu ile önemli bir şekilde azaldığı ve sol ventrikül fonksiyonlarının iyileştiği bulunmuştur. İvabradinin bu etkilerinin diyabetik sıçanlarda daha az olduğu tespit edilmiştir (Cao ve ark., 2016).

İnflamasyon, diyabetik kardiyomiyopati gelişiminde önemli rol oynamaktadır ve diyabetik hastalarda kalp yetmezliği gelişimi için temel risk faktörlerindendir. İvabradin tedavisinin antiinflamatuvar etkisinin olup olmadığı STZ-diyabetik C57BL/6J farelerde incelenmiştir. Oniki haftalık tedaviden sonra ivabradinin kan glukoz seviyesini değiştirmediği, tümör nekrotik faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), interlökin-1 (IL-1)  $\beta$  ve IL-2 ekspresyonlarını azalttığı bulunmuştur. İvabradinin antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkisine C-Jun N-Terminal Kinaz (JNK), p38 mitojenle etkinleşen protein kinaz (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*) aktivasyonunu inhibe etmesinin aracılık ettiği gösterilmiştir. İvabradinin kardiyak yararlı etkilerinin kalp

atım hızında oluşturduğu azaltıcı etkiye bağlı olduğu ifade edilmiştir. Bu sonuçlar ivabradinin diyabetik kardiyomiyopatinin önlenmesi ve tedavisinde potansiyel önemli bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmektedir (Zuo ve ark., 2018). Araştırmacılar daha sonra yaptıkları başka bir çalışmada ise ivabradinin antiapoptotik etkisinin mekanizmasını daha ayrıntılı bir şekilde araştırmışlardır. STZ-diyabetik C57BL/6J farelerde ivabradinin direkt olarak protein fosfataz 2A katalitik alt ünitesini (PP2Ac) aktive ettiğini, böylece NFκB sinyal aktivasyonunu azalttığını ve bunlara bağlı olarak da antiapoptotik ve antifibrotik etkileri olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada ivabradinin antiapoptotik etkisinin I<sub>f</sub> kanal inhibisyonundan bağımsız olup olmadığı araştırılmıştır. Bunun için yüksek glukozlu hücre kültürü ortamında HCN2 ve HCN4 izoformlarının genleri susturucu ribonükleik asit (siRNA) tekniği ile susturulmuş ve apoptozis parametrelerinin değişmediği bulunmuştur. Böylece ivabradinin diyabetteki antiapoptotik etkisinin I<sub>f</sub> kanal inhibisyonundan bağımsız olduğu sonucuna varılmıştır (Zuo ve ark., 2019).

Tip I (STZ) ve Tip II (db/db) diyabetik farelerde HCN2 kanalının diyabetik ağrının kontrolünde rol oynayıp oynamadığının araştırıldığı bir çalışmada HCN2 kanalının bloke edilmesinin diyabetik nöropati tedavisi için analjezik etki gösterebileceği öne sürülmüştür (Tsantoulas ve ark., 2017).

STZ-diyabetik ve kontrol sıçanların sinoatriyal düğümlerindeki HCN izoformlarının ekspresyonlarındaki değişimin araştırıldığı bir çalışmada STZ-diyabetik sıçanların kontrol grubuna kıyasla intrinsik kalp atım hızının azaldığı, sinoatriyal iletim zamanının uzadığı bulunmuştur. STZ-diyabetik sıçanlarda HCN2 ve HCN4 izoformlarının azaldığı tespit edilmiştir. Langendorff sisteminde perfüze edilen kalplere ivabradin (3 µM) uygulanması ile STZ-diyabetik sıçanlarda döngü uzunluğu (CL, *Cycle Length*) %18, kontrol sıçanlarda ise %26 uzamıştır. Araştırmacılar STZ-diyabetik sıçanlarda HCN izoformlarının ekspresyonunun azalması ile sinoatriyal düğüm fonksiyonlarının kötüleşmesi arasında ilişki olabileceğini öne sürmüşlerdir. Sonuçlarını doğrulayabilmek için elektrofizyolojik fonksiyonel testlerin yapılmasına ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (Huang ve ark., 2016).

Randomize, çok merkezli, çift-kör olarak gerçekleştirilmiş sekiz kontrollü klinik araştırma verisinin meta analizinde diyabetin; ivabradinin ve aktif metabolitlerinin farmakokinetik özelliklerini, kalp atım hızını azaltıcı özelliğini ve antianjinal etkisini değiştirmedeği bildirilmiştir. İlginç olarak bu analizde, ivabradin tedavisi ile diyabetik hastaların hemoglobin A1c (HbA1c) ve açlık kan şekeri düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir (Borer ve Tardif, 2010).

Diyabetik hastalarda kalp atım hızının azaltılmasının endotel fonksiyonlar üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada 66 Tip II diyabet hastasına dört hafta süreyle atenolol, ivabradin ya da plasebo verilmiştir. Tedavi süresinin sonunda yalnızca atenolol tedavili grupta akış aracılı dilatasyon (FMD, *Flow-Mediated Dilation*) artmıştır. Endotel bağımsız dilatasyon (NMD, *Nitroglycerin-mediated Dilation*) ise bütün gruplarda benzer bulunduğu için diyabetik hastalarda ivabradinin endotel fonksiyonlara etki göstermediği bildirilmiştir (Nerla ve ark., 2012).

Kondrat'ev ve ark.'larının (2010) yaptığı klinik bir çalışmada akut koroner sendrom tanısı olan Tip II diyabet hastalarında stabil anjina pectoris tedavisine ivabradin eklenmesi kalp atım hızı ve MI ataklarının sayısını azaltmıştır. Ayrıca ivabradin ile tedavi edilen grupta LVEF'de artış olduğu ve yan etkilerin gözlenmediği bulunmuştur. İvabradinin iyi tolere edilebilen bir ajan olduğu yorumu yapılmıştır (Kondrat'ev ve ark., 2010).

Çizelge 1.2.'de diyabet ve ivabradin çalışmalarının sonuçları özetlenmiştir.

**Çizelge 1.2.** Diyabet ve İvabradin Çalışmaları

| Çalışmanın adı                                                                                                                                                                                        | Çalışmanın yazarları ve yılı | Çalışmanın en önemli sonucu                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>I(f) current channel inhibitor (ivabradine) deserves cardioprotective effect via down-regulating the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and attenuating apoptosis in diabetic mice</b> | (Chen ve ark., 2014)         | -Diyabetik farelerde ivabradin (10 mg/kg/gün, 3 ay) tedavisi antiapoptotik etkilidir ve kardiyak fonksiyonlarda önemli bir iyileşme sağlar. |
| <b>Heart rate reduction by If inhibition improves vascular stiffness and left ventricular systolic and diastolic function in a mouse model of heart failure with preserved ejection fraction</b>      | (Reil ve ark., 2013)         | -db/db farelerde 4 haftalık ivabradin tedavisi vasküler sertliği, sol ventrikül kontraktilitesini ve diyastolik fonksiyonu düzeltir.        |

**Çizelge 1.2. Diyabet ve İvabradin Çalışmaları (Devam)**

| Çalışmanın adı                                                                                                                                                      | Çalışmanın yazarları ve yılı | Çalışmanın en önemli sonucu                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>The Effects of Ivabradine on Cardiac Function after Myocardial Infarction are Weaker in Diabetic Rats</b>                                                        | (Cao ve ark., 2016)          | -Kronik kalp yetmezliğinden sonra STZ-diyabetik ve diyabetik olmayan sıçanlarda artmış olan noradrenalin ve BNP-45 seviyesi ivabradin enjeksiyonundan sonra azalır ve sol ventrikül fonksiyonları iyileşir. Bu etkiler STZ-diyabetik sıçanlarda daha azdır.                 |
| <b>Inhibition of JNK and p38 MAPK-mediated inflammation and apoptosis by ivabradine improves cardiac function in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy</b> | (Zuo ve ark., 2018)          | -STZ-diyabetik farelerde 12 haftalık ivabradin tedavisi kan glukoz seviyesini değiştirmez, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ve IL-2 ekspresyonlarını azaltır. -İvabradinin antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkisinde JNK, p38 MAPK aktivasyonunun inhibe etmesi aracılık eder. |
| <b>Activation of the PP2A catalytic subunit by ivabradine attenuates the development of diabetic cardiomyopathy</b>                                                 | (Zuo ve ark., 2019)          | -STZ-diyabetik farelerde ivabradin direkt olarak PP2Ac'ı aktive eder, NF $\kappa$ B sinyal aktivasyonunu inhibe eder. Böylece miyokardiyal antiapoptotik ve antifibrotik etki gösterir. -İvabradinin antiapoptotik etkisi I $_f$ kanal inhibisyonundan bağımsızdır.         |
| <b>Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated 2 (HCN2) ion channels drive pain in mouse models of diabetic neuropathy</b>                                  | (Tsantoulas ve ark., 2017)   | -Tip I (STZ-diyabetik) ve Tip II diyabet (db/db) farelerde HCN2 kanalının bloke edilmesi diyabetik ağrının kontrolünde rol oynar.                                                                                                                                           |
| <b>Reduced expression of HCN channels in the sinoatrial node of streptozotocin-induced diabetic rats</b>                                                            | (Huang ve ark., 2016)        | -STZ-diyabetik sıçanlarda HCN2 ve HCN4 izoformları azalmıştır. Langendorff sisteminde perfüze edilen kalplerde ivabradin (3 $\mu$ M) STZ-diyabetik sıçanlarda CL'yi %18, kontrol sıçanlarda ise %26 uzatmıştır.                                                             |
| <b>Efficacy of Ivabradine, a Selective If Inhibitor, in Patients With Chronic Stable Angina Pectoris and Diabetes Mellitus</b>                                      | (Borer ve Tardif, 2010)      | -Diyabet; ivabradinin ve aktif metabolitlerinin farmakokinetik özelliklerini, kalp atım hızını azaltıcı ve antianjinal etkisini değiştirmez. -İvabradin diyabetik hastaların HbA1c ve açlık kan şekeri düzeyini azaltır.                                                    |
| <b>Differential effects of heart rate reduction by atenolol or ivabradine on peripheral endothelial function in type 2 diabetic patients</b>                        | (Nerla ve ark., 2012)        | -Tip II diyabet hastalarda 4 haftalık ivabradin tedavisi endotel fonksiyonları etkilemez.                                                                                                                                                                                   |
| <b>Efficacy of ivabradine in combination therapy for complicated acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes mellitus</b>                              | (Kondrat'ev ve ark., 2010)   | -Akut koroner sendrom tanısı olan Tip II diyabet hastalarda stabil olmayan anjina pectoris tedavisine ivabradin eklenmesi kalp atım hızını ve MI ataklarını azaltır.                                                                                                        |

## 1.6. HCN Kanallarının Ekspresyonlarının Değiştiği Durumlar

HCN izoformların dağılımları ve ekspresyonları türe, yaşa, dokuya, hücreye ve patolojik duruma (hipertansiyon, hipertrofi, kalp yetmezliği) göre değişkenlik göstermektedir (Herrmann ve ark., 2011).

Kardiyak hipertrofi, iskemi ve kalp yetmezliği oluşturulmuş hayvan modellerinde ve klinik çalışmalarda ventriküler miyositlerde bulunan  $I_f$  kanallarının ekspresyonlarının arttığını destekleyen pek çok çalışma bulunmaktadır (Cerbai ve ark., 1994; Cerbai ve ark., 1996; Cerbai ve ark., 2000; Fernandez-Velasco ve ark., 2003; Sartiani ve ark., 2006 ve Stilli ve ark., 2001).

Hipertrofik sıçan ventrikül miyositlerinde  $I_f$  dansitesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur (Cerbai ve ark., 1996 ve Stilli ve ark., 2001).

Yapılan bir çalışmada kontrol ve hipertrofik sıçanlardan izole edilen üç farklı ventrikül bölgesinde (septum, duvar içermeyen sağ ve sol ventrikül) HCN2 ve HCN4 izoformlarının mesajcı ribonükleik asit (mRNA) seviyelerindeki ve  $I_f$  akımındaki değişimler araştırılmıştır. Sol ve sağ ventrikül bölgeleri epikardiyal hücrelerden oluşurken, septum bölgesi endokardiyal hücrelerden oluşmaktadır. Bu çalışmada hipertrofik sıçanlarda kontrole kıyasla HCN2 ve HCN4 mRNA seviyesinin septum ve sol ventrikül bölgelerinde arttığı, sağ ventrikül bölgesinde ise değişmediği bulunmuştur. Aynı zamanda bu çalışmada HCN1 izoformunun da varlığı araştırılmış fakat, bu izoformun kontrol ve hipertrofik sıçanların ventrikül miyositlerinde varlığı tespit edilmemiştir (Fernandez-Velasco ve ark., 2003). Üstelik önceki çalışmalarda kardiyak hipertrofi (Cerbai ve ark., 1994; Cerbai ve ark., 1996 ve Stilli ve ark., 2001) ve kalp yetmezliği (Cerbai ve ark., 1997 ve Hoppe ve ark., 1998) modellerinde HCN izoformlarının arttığı gösterilmiş olmasına rağmen hipertrofik ventriküler miyositlerde HCN2 ve HCN4 izoformlarının mRNA seviyeleri ve  $I_f$  akımındaki değişim ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Yani ilk kez bu çalışma ile  $I_f$  akımındaki upregülasyon ile HCN2 ve HCN4 upregülasyonu arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Fernandez-Velasco ve ark., 2003).

Fizyolojik koşullarda ventrikölde HCN2 ve HCN4 izoformları baskın olarak bulunmaktadır. Araştırmacılar hipertrofik hayvanların ventriköllerinde HCN1 ekspresyonunun kontrole kıyasla fazla olduğunu bulmuşlardır. Yapılan öteki çalışmaların aksine hipertrofi modelinde kontrole kıyasla HCN2 ve HCN4 izoformlarının mRNA seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Bu sonuçlar daha önce yapılmış olan hayvan (Fernandez-Velasco ve ark., 2003 ve Hiramatsu ve ark., 2002) ve insan çalışmalarının (Borlak ve Thum, 2003 ve Stillitano ve ark., 2008) sonuçları ile çelişmektedir. Hiramatsu ve ark. (2002) ilk kez hipertrofik sıçan kalbinde HCN2 ve HCN4 izoformlarının ekspresyonlarının daha fazla olduğunu ortaya koymuşlardır (Hiramatsu ve ark., 2002). Bu çalışmaların sonuçlarının birbirinden farklı olmasının sebebi kullanılan hayvan türünün ya da ventriküler hipertrofi modellerinin değişken olması ile ilişkili olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Hofmann ve ark., 2012).

Pek çok çalışmada *pacemaker*  $I_f$  akımının hipertrofik kalpte aritmi oluşumuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Cerbai ve ark., 1996; Cerbai ve ark., 2001 ve Stilli ve ark., 2001).  $I_f$  akımı primer ve sekonder otomasite oluşturan bölgeler (DiFrancesco, 1995) ile otomasite oluşturmeyen bölgelerde bulunmaktadır. İnsan (Hoppe ve ark., 1998), guinea pig (Yu ve ark., 1993), köpek (Yu ve ark., 1995) ve sıçan (Cerbai ve ark., 1994 ve Robinson ve ark., 1997) ventriküler miyositlerinde  $I_f$  akımının bulunduğu gösterilmiştir (Fernandez-Velasco ve ark., 2003).

$I_f$  kanalının kardiyak hipertrofi ve yetmezlikte aritmojenik etkiye katkı sağladığını gösteren yapılan çalışmalar da bulunmaktadır (Cerbai ve ark., 1994; Cerbai ve Mugelli, 2006 ve Hoppe ve ark., 1998). Bu durumun mekanizması tam olarak belirlenememiştir.

Hipertrofik ya da yetmezlikli kalpte HCN2 ve HCN4 izoformlarının artışına bağlı olarak aritmi insidansının arttığı tespit edilmiştir (Borlak ve Thum, 2003 ve Fernandez-Velasco ve ark., 2003).

HCN kanal aktivitesinin hipertrofik miyositlerde artması, ventriküler aksiyon potansiyelinin repolarizasyonunu uzatmış ve böylece aritmojenik etki oluşturmuştur (Hofmann ve ark., 2012).

Başka bir klinik çalışmada atriyal fibrilasyonu olan hastalarda atriyal dokuda HCN4 izoformunun mRNA düzeyi azalırken protein seviyesinin değişmediği bulunmuştur (Murray, 2013).

Stillitano ve ark.'larının (2008) çalışmasında yetmezlikli insan atriyal dokusunda HCN2 ve HCN4 izoformlarının mRNA ve protein seviyelerinin arttığı tespit edilirken, ventrikül dokusunda yalnızca HCN4 seviyesinin arttığı gösterilmiştir (Stillitano ve ark., 2008).

2008 yılında yapılan bir çalışmada aortik baroreseptör nöronların eksitabilitesinin STZ-diyabetik sıçanlarda baskılanıp baskılanmadığı ve HCN izoformlarının ekspresyonundaki değişim araştırılmıştır. STZ-diyabetik sıçanlarda HCN akımının dansitesinin *sham* grubu ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu bulunmuştur. HCN kanal blokerleri olan CsCl ve ZD7288 molekülleri hem *sham* hem de diyabetik grupta HCN akımını anlamlı bir şekilde azaltmıştır. Bu sonuçlar A lifli aortik baroreseptör nöronların eksitabilitenin düzenlenmesinde HCN kanallarının rol oynadığını göstermektedir. *Sham* grubunda HCN kanallarının varlığı A lifli nöronlarda tespit edilmemiştir. A lifli nöronlarda HCN2 izoformunun ekspresyonunun diyabetik sıçanlarda arttığı bulunmuştur. Diyabetik sıçanların A lifli aortik baroreseptör nöronların eksitabilitesinin *sham* grubuna kıyasla baskılandığı tespit edilmiştir. Ayrıca diyabetik grupta HCN kanallarının cAMP'ye duyarlılığının arttığı gözlenmiştir (Li ve ark., 2008).

Tu ve ark. (2010) bir çalışmada *sham* ve STZ-diyabetik sıçanların nodoz gangliyon afferent nöronlarında (A ve C lifli) HCN izoformlarının elektrofizyolojik karakterizasyonları ve ekspresyonları araştırılmıştır. Kontrol A lifli nöronlarda HCN1, HCN3 ve HCN4; C lifli nöronlarda ise HCN2, HCN3 ve HCN4 izoformlarının eksprese edildiği bulunmuştur. STZ-diyabetik sıçanların A lifli

nöronlarında HCN2 varlığı tespit edilmiş ve bu nöronlarda HCN1 ve HCN3 ekspresyonlarının arttığı bulunmuştur. STZ-diyabetik sıçanların C lifli nöronlarında HCN2 ve HCN3 ekspresyonları artarken, A ve C lifli nöronlarda HCN4 izoformunun ekspresyonunun değişmediği gözlenmiştir. Sonuç olarak, diyabetik sıçanlarda HCN izoformlarının ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Diyabet A lifli nöronlarda HCN kanalları cAMP ile modüle edildiği, *sham* grubunda cAMP ile modüle edilmediği tespit edilmiştir. C lifli nöronlarda ise HCN kanallarının cAMP'ye duyarlılığın iki grupta da değişmediği gözlenmiştir (Tu ve ark., 2010).

Deneyisel araştırmalar ve klinik çalışmalar ivabradinin kardiyovasküler sistemdeki faydalı etkilerinin sadece kalp atım hızını azaltmasından kaynaklanmadığını desteklemektedir. Bu tez çalışmasının temel amacı,

- İvabradinin pleiotropik etkilerinin tespit edilmesi ve bu etkilerinin moleküler mekanizmasının ortaya konması,
- İvabradinin sağlıklı, kontrol damarlarda doğrudan etkisinin araştırılması,
- Damarlardaki etkilere endotel katkısının araştırılması için endotel hasar oluşumunun gözleendiği diyabet modelinde hasarın tedavi edilmesi ya da engellenmesi,
- İvabradinin olası antihipertrofik etkisinin diyabetik deney hayvanlarında ve kardiyomiyosit hücrelerde oluşturulan hipertrofi modelinde incelenmesi,
- HCN izoformlarının lokalizasyon ve ekspresyonlarının diyabet ve/veya kronik ivabradin tedavisinden nasıl etkilendiğinin kalp ve damar dokularında araştırılması,
- Endotel hücre serilerinde, HCN izoformlarının varlığının ve eksprespresyonundaki değişimin gösterilmesi,
- Sıçanlarda ivabradin tedavisinin NO ve oksidatif strese üzerine etkisinin araştırılmasıdır.

Böylece ivabradinin kardiyovasküler pleiotropik etkileri ve bu etkilerine aracılık eden mekanizmalar hayvan ve hücre kültürü çalışmaları ile tespit edilebilecektir. Bu tez çalışması, ivabradinin endotel disfonksiyonuna yol açan herhangi bir kardiyovasküler hastalıkta kullanılabilmesi için temel oluşturacaktır.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmalar Sprague Dawley sıçanlarda, İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücresi (HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cell*) ve sıçan miyosit hücresi olan H9c2 hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında “Giriş” başlığı altında anlatılan hedeflere yönelik olarak;

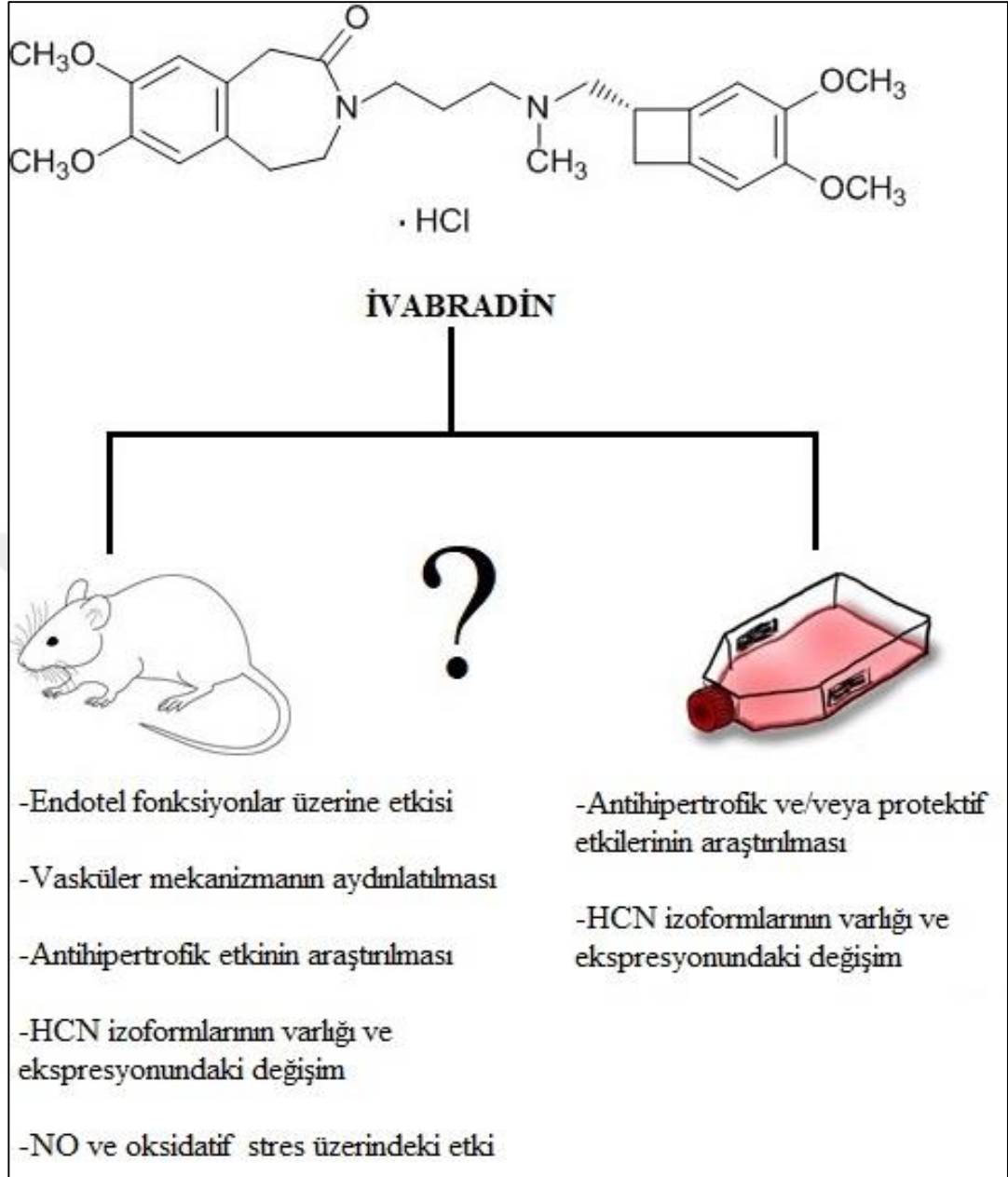
-Sağlıklı ve diyabetik damarlarda ivabradinin endotel fonksiyonlar üzerine etkisi,

-Diyabetik sıçanlarda ve hipertrofi modeli oluşturulmuş hücre hattında ivabradinin olası antihipertrofik etkisi,

-Endotel hücre serilerinde ve damarlarda HCN izoformlarının lokalizasyon ve ekspresyonlarının ivabradin uygulamasından nasıl etkilendikleri,

-Damarlarda STZ diyabet ve/veya ivabradin tedavisinin NO ve oksidatif strese etkileri değerlendirilmiştir.

Şekil 2.1.’de tez çalışmasında ivabradinin kardiyovasküler yararlı etkilerinin mekanizmasını aydınlatmak amacıyla incelenen parametreler gösterilmektedir.



**Şekil 2.1.** İvabradinin Kardiyovasküler Yararlı Etkilerinin Hayvan ve Hücre Kültürü Çalışmaları ile İncelenmesi

## 2.1. Kullanılan Gereçler

### 2.1.1. Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar Çizelge 2.1’de listelenmiştir.

**Çizelge 2.1. Cihazlar**

| <b>Kullanılan Cihaz</b>                                       | <b>Marka-Model</b>                              |
|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Tail-cuff kan basıncı ve kalp atım hızı ölçüm sistemi         | Commat                                          |
| Veri kayıt ve analiz sistemi                                  | MP30B-CE Biopac System, Inc., Santa Barbara, CA |
| İzole organ banyosu (Dörtlü)                                  | May IOBS 99                                     |
| %95 O <sub>2</sub> %5 CO <sub>2</sub> içeren gaz karışım tüpü | Antgaz                                          |
| Kan şekeri ölçüm cihazı                                       | ACCU-CHEK® Performa                             |
| Buz makinesi                                                  | Hoshizaki FM120DE                               |
| Otoklav                                                       | ALP                                             |
| Santrifüj                                                     | Hettich, Rotina 35R                             |
| Santrifüj (soğutmalı)                                         | Hettich, Micro200R                              |
| Dikey elektroforez                                            | Bio-Rad                                         |
| Güç kaynağı                                                   | Bio-Rad                                         |
| Orbital çalkalayıcı                                           | Yellow Line                                     |
| Kuru ısıtıcı                                                  | Major Science                                   |
| Laminar akış kabini                                           | Holten                                          |
| İnkübatör                                                     | Sanyo, Nuve EN 500P                             |
| Mikroplak okuyucu                                             | Spektramax 190                                  |
| pH metre                                                      | Isolab, Mettler Toledo                          |
| Manyetik karıştırıcı                                          | Isolab, Heidolph                                |
| Kaba terazi                                                   | Scaltec, SBA61                                  |
| Hassas terazi                                                 | Kern                                            |
| Etüv                                                          | Blue Pard, PH050A                               |
| Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler                          | Eppendorff, Gilson, Microlit                    |
| <i>Inverted</i> mikroskop                                     | Leica                                           |
| Işık mikroskobu                                               | Leica, DM2500                                   |
| Floresan mikroskop                                            | Leica, DMİ8                                     |
| Vortex                                                        | Velp Scientifica                                |
| Hücre kazıyıcı ( <i>Cell Scraper</i> )                        | Greiner                                         |
| Mikrotom cihazı                                               | Leica, RM2125 RTS                               |

### 2.1.2. Kimyasal Maddeler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 2.2.'de listelenmiştir.

**Çizelge 2.2.** Kimyasal Maddeler

| KİMYASAL                                                                                        | MARKA                       | KATALOG NUMARASI   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| Sıçan yemi                                                                                      | Purina                      | -                  |
| STZ                                                                                             | Sigma                       | #S0130             |
| Coralan® tablet                                                                                 | Servier                     | -                  |
| Potasyum klorür (KCl)                                                                           | Sigma                       | #12636             |
| Sodyum klorür (NaCl)                                                                            | Merck                       | #M106404           |
| D-glukoz monohidrat                                                                             | Sigma                       | #16301             |
| Magnezyum sülfat heptahidrat (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O )                            | Merck                       | #M105886           |
| Potasyum fosfat monobazik (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )                                    | Merck                       | #M104873           |
| Sodyum bikarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )                                                         | Sigma                       | #31437             |
| Kalsiyum klorür (CaCl <sub>2</sub> )                                                            | Sigma                       | #12022             |
| Fenilefrin hidroklorür                                                                          | Sigma                       | #P6126             |
| Asetilkolin klorür                                                                              | Sigma                       | #A6625             |
| İvabradin hidroklorür                                                                           | Sigma                       | #SML0281           |
| Propranolol hidroklorür (PROP)                                                                  | Sigma                       | #P0884             |
| Tetraetilamonyum klorür (TEA)                                                                   | Sigma                       | #T-2265            |
| L-NAME                                                                                          | Sigma                       | #N5751             |
| İzoprenalin hidroklorür                                                                         | Sigma                       | #I5627             |
| Sodyum nitroprussid (SNP)                                                                       | Sigma                       | #71778             |
| Ketamin hidroklorür                                                                             | Ketalar, Pfizer             | -                  |
| Heparin                                                                                         | Nevparin, Mustafa Nevzat    | -                  |
| Dimetil sülfoksit (DMSO)                                                                        | Merck                       | #317275            |
| Proteaz inhibitör kokteyli (PIK)                                                                | Cell Signaling Technologies | #5871              |
| Sodyum ortovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )                                           | Sigma                       | #450243            |
| Radyoimmünopresipitasyon tampon çözeltisi (RIPA, <i>Radioimmunoprecipitation Assay Buffer</i> ) | VWR Life Science, Sigma     | #97063-270, #R0278 |
| Bikinkoninik asit (BCA) protein miktar tayini kiti                                              | Thermo Fisher Scientific    | #23225             |
| %30 Akrilamid/Bis solüsyonu (5:1)                                                               | Bio-Rad                     | #161-0158          |
| Yükleme jel solüsyonu                                                                           | Bio-Rad                     | #161-0799          |
| Ayrılcı jel solüsyonu                                                                           | Bio-Rad                     | #161-0798          |
| Protein standardı                                                                               | Bio-Rad                     | #161-0374          |

**Çizelge 2.2. Kimyasal Maddeler (Devam)**

| KİMYASAL                                                                                      | MARKA                 | KATALOG NUMARASI   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------|
| Tween20                                                                                       | Bio-Rad               | #161-0781          |
| Tetrametiletilendiamin (TEMED)                                                                | Bio-Rad               | #1610801           |
| Amonyum persülfat (APS)                                                                       | Bio-Rad               | #1610700           |
| Sodyum dodesil sülfat (SDS)                                                                   | Bio-Rad               | #1610302           |
| Gliserol                                                                                      | Sigma                 | #15524             |
| Trisle tamponlanmış salin (TBS, <i>Tris-Buffered Saline</i> )                                 | Bio-Rad               | #1706435           |
| Tris/Glisin (TG)                                                                              | Bio-Rad               | #161-0734          |
| Tris/Glisin/SDS (TGS)                                                                         | Bio-Rad               | #161-0732          |
| Metanol                                                                                       | LiChrosolv, Merck     | #67-56-1, # 106018 |
| Polivinilidin florür (PVDF) membran                                                           | Bio-Rad               | #162-0177          |
| Nitroselüloz membran                                                                          | Bio-Rad               | #162-0112          |
| Sığır serum albumini (BSA, <i>Bovine Serum Albumin</i> )                                      | Equitech-Bio          | #BAH66             |
| Artırılmış kemilüminesans (ECL, <i>Enhanced Chemiluminescence</i> ) reaktifi (Clarity)        | Bio-Rad               | #1705060           |
| ECL (Clarity max)                                                                             | Bio-Rad               | #1705062           |
| Röntgen film                                                                                  | Fuji Film             | #47410             |
| Developer çözeltisi (Otomatik Konsantre Röntgen Banyo Solüsyonu)                              | Konix                 | -                  |
| Fixer çözeltisi (Otomatik Konsantre Röntgen Banyo Solüsyonu)                                  | Konix                 | -                  |
| Norepinefrin hidroklorür                                                                      | Sigma                 | #A7256             |
| Fetal sığır serumu (FBS, <i>Fetal Bovine Serum</i> )                                          | Biowest               | #S1810             |
| Fosfat tamponlu salin (PBS, <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )                                | Biological Industries | # 02-020-1A        |
| DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , yüksek glukoz)                               | Biowest               | #L0103             |
| DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , düşük glukoz)                                | Biowest               | #L0066             |
| Penisilin-streptomisin çözeltisi                                                              | Biowest               | #L0018             |
| Tripsin EDTA (etilen diamin tetra asetik asit)                                                | HyClone               | #SH30042.01        |
| Tripan mavisi                                                                                 | Lonza                 | #17-942E           |
| Super oksit dismutaz (SOD) ölçüm kiti                                                         | Cayman                | #706002            |
| Rat p-selektin ELISA (İmmünoenzimatik Yöntem, <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> ) kiti | Elabscience           | #E-EL-R0828        |
| Rat VCAM-1 ELISA kiti                                                                         | Elabscience           | #E-EL-R1061        |
| 4',6-diamidino-2-fenilindol diklorür (DAPI) boyası                                            | Sigma                 | #D9542             |
| DAF-2DA boyası                                                                                | Merck                 | #251505            |
| DHE boyası                                                                                    | Thermo Fisher         | #D11347            |

**Çizelge 2.2.** Kimyasal Maddeler (Devam)

| KİMYASAL                     | MARKA             | KATALOG NUMARASI |
|------------------------------|-------------------|------------------|
| Formaldehit                  | Merck             | #103999          |
| %100 etil alkol              | Merck             | #100983          |
| Entellan                     | Merck             | #107961          |
| p-Ksilen                     | Merck             | #108684          |
| Anilin mavisi                | Sigma             | #415049          |
| Fuksin boyası                | Merck             | #115937          |
| Orange G                     | Merck             | #115925          |
| Hematoksilin                 | Merck             | #104302          |
| Tissue Plus OCT Compound     | Fisher Scientific | #23-730-571      |
| Triton X-100                 | Merck             | #108603          |
| Tungstofosforik asit hidrat  | Merck             | #100582          |
| Fluoroshield mounting medium | Abcam             | #ab104135        |
| Parafin                      | Merck             | #107337          |
| H9c2 hücre hattı             | ATCC              | #CRL-1446        |
| HUVEC hücre hattı            | ATCC              | #CRL-1730        |

### 2.1.3. Antikorlar

Bu tez çalışmasında kullanılan antikorlar Çizelge 2.3.'te listelenmiştir.

**Çizelge 2.3.** Antikorlar

| ANTİKOR                                                                 | MARKA                       | KATALOG NUMARASI |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|------------------|
| HCN1                                                                    | Alomone Labs                | #APC-056         |
| HCN2                                                                    | Alomone Labs                | #APC-030         |
| HCN3                                                                    | Alomone Labs                | #APC-057         |
| HCN4                                                                    | Alomone Labs                | #APC-052         |
| Fosforile eNOS (p-eNOS)                                                 | Thermo Fisher Scientific    | #MA5-14957       |
| eNOS                                                                    | Thermo Fisher Scientific    | #PA3-031A        |
| Fosforile Akt (p-Akt)                                                   | Cell Signaling Technologies | #9271            |
| Akt                                                                     | Cell Signaling Technologies | #9272            |
| ANP                                                                     | Novus Biologicals           | #NBP2-14872      |
| HRP ( <i>Horseradish</i> Peroksidaz) bağlı anti-tavşan sekonder antikor | Cell Signaling Technologies | #7074            |
| Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH)                             | Cell Signaling Technologies | #2118            |
| $\beta$ aktin                                                           | Cell Signaling Technologies | #4967            |

## 2.2. Sıçanlarda Gerçekleştirilen Çalışmalar

Çalışmalarda kullanılan sıçanlar “Bilkent Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Ünitesi”nden temin edilmiştir. Sıçanlar çalışma boyunca Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi’nde sabit koşullarda ( $22\pm1^{\circ}\text{C}$  sıcaklık, % 30-70 nem, aydınlık/karanlık döngüsü 12/12 saat (sa)) barındırılmıştır. Hayvan çalışmalarına başlamadan önce “Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul”undan etik kurul onayı alınmıştır (Etik kurul karar no: 2016-5-58, Ek-1).

Sekiz haftalık 200-250 gram (g) ağırlığında Sprague Dawley erkek sıçanlar kullanılmıştır. Deney grupları hayvanların beden ağırlıklarına göre eşleştirilerek ve her gruptaki beden ağırlığı ortalaması benzer olacak şekilde oluşturulmuştur.

Grupların dağılımı aşağıda belirtilen şekilde yapılmıştır:

**Grup 1:** Kontrol grubu (K), (hiçbir uygulama yapılmamıştır)

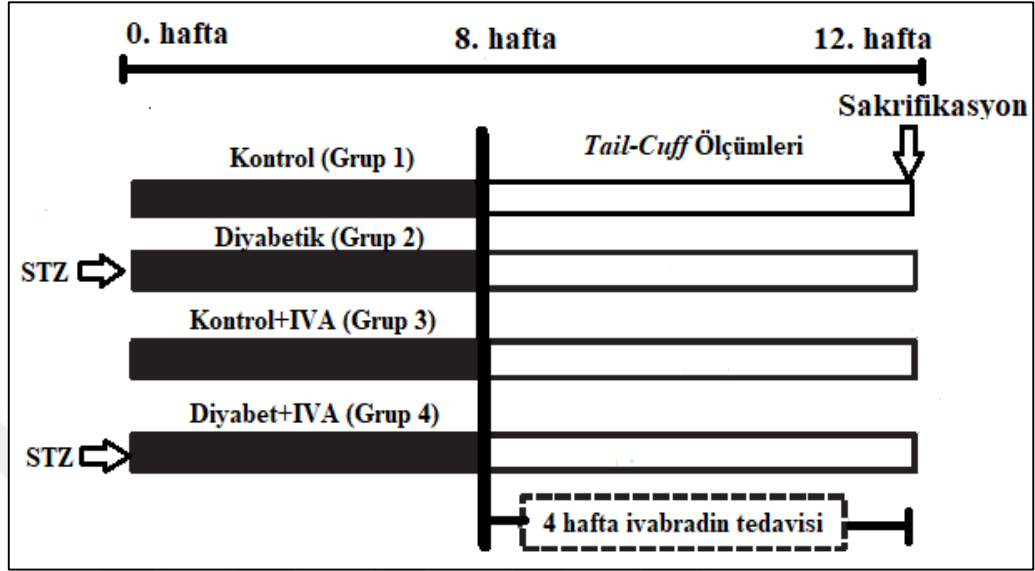
**Grup 2:** STZ-diyabetik (D)

**Grup 3:** Kontrol +ivabradin tedavisi (KI)

**Grup 4:** STZ-diyabetik +ivabradin tedavisi (DI)

Çalışmada toplam 68 hayvan kullanılmıştır. Hayvanların bir bölümüne literatür bilgilerine uygun olarak 0,1 M sitrat tamponunda (pH: 4,5) çözölmüş STZ (40 mg/kg, i.p injeksiyon) tek doz olacak şekilde uygulanmıştır (Liu ve ark., 2012). Kontrol sıçanlara da aynı hacimde sitrat tamponu uygulanmıştır. STZ injeksiyonundan 72 sa sonra sıçanların kuyruklarından alınan kanla kan şekeri ölçölerek diyabet oluşumu doğrulanmıştır. Kan şekeri 300 mg/dl ve üzeri olan hayvanlar diyabet kabul edilmiştir. Diyabet oluşturulduktan sonra 12 hafta beklenerek sıçanlarda kardiyovasküler bozuklukların oluşması sağlanmıştır. Sekizinci haftadan itibaren dört hafta süreyle oral yolla ivabradin (10 mg/kg/gün,

distile suda çözülmüş) (Custodis ve ark., 2008) tedavisi uygulanmıştır. Deney hayvanlarının tedavi protokolü Şekil 2.2.'de şematize edilmiştir.



Şekil 2.2. Sıçanların Tedavi Protokolünün Şematik Gösterimi

İlk sette, endotel hasarı ya da ivabradin ile tedavi edici etkinlik belirlenememesi durumunda diyabet ya da tedavi süresini uzatabilmek gibi deneysel düzenlemeler yapılabilmesi amacıyla çalışmalar iki set halinde tasarlanmıştır. Yapılan değerlendirmeler sonucunda gruplarda ve tedavi protokolünde değişiklik yapılmasına gerek duyulmamıştır. Değişiklik yapılmadığı için analizler her iki sette elde edilen verilerin birleştirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Birinci ve ikinci sette kullanılan hayvan sayılarının gruplara göre dağılımı çizelge 2.4'te şematize edilmiştir.

Çizelge 2.4. Deney Gruplarındaki Hayvanların Dağılımı

| Deney Grupları                                   | 1.Set | 2.Set |
|--------------------------------------------------|-------|-------|
| Kontrol grubu (K) (Grup 1)                       | 6     | 7     |
| STZ-diyabetik (D) (Grup 2)                       | 9     | 8     |
| Kontrol+ ivabradin tedavisi (KI) (Grup 3)        | 8     | 8     |
| STZ-diyabetik + ivabradin tedavisi (DI) (Grup 4) | 13    | 9     |

Özetle bu tez çalışması kapsamında sıçanlarda gerçekleştirilen çalışmalar:

- STZ-diyabet ve ivabradin tedavisinin beden ağırlığı, kan şekeri, kan basıncı ve kalp atım hızı üzerine etkisinin araştırılması,
- STZ-diyabet ve ivabradin tedavisinin damarlardaki vasküler etkilerini değerlendirmek için izole organ banyosu çalışmaları,
- STZ-diyabet ve ivabradin tedavisinin hipertrofi, NO ve oksidatif strese etkisini değerlendirmek için damar ve kalp kesitlerinde histolojik incelemeler,
- Endotel fonksiyon ve oksidatif stres belirteçlerinin STZ-diyabet ve ivabradin tedavisinden nasıl etkilendiklerinin belirlenmesi için biyokimyasal incelemeler,
- HCN izoformlarının ekspresyonları, eNOS ve Akt proteinlerinin fosforilasyonları ve ayrıca hipertrofi belirteci olan ANP proteinin ekspresyonları değerlendirmek için Western blot yöntemi ile protein miktar tayini çalışmaları.

### **2.2.1. Beden Ağırlıkları ve Kan Şekeri Ölçümleri**

Dört deney grubundaki sıçanların haftalık olarak beden ağırlıkları ve kan şekeri ölçümleri yapılmıştır. Kan şekeri ölçümleri konvansiyonel olarak bulunan strip ve ölçüm cihazı yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

### **2.2.2. Kan Basıncı ve Kalp Atım Hızı Parametrelerinin Ölçümü**

Sıçanların kan basıncı ve kalp atım hızları tedaviden önce, tedavinin 1. ve 3.haftalarında *Tail-Cuff* sistemi ile düzenli olarak ölçülmüştür. Bu yöntemle göre sıçanlar öncelikle 15 dak 35°C'lik özel dolaplarda bekletilmiş ve ardından hareketsiz kalmalarını sağlayacak küçük bölmelere (*restrainer*) alınmıştır. Manşet sıçanların kuyruklarına takılmış ve sistem otomatik kan basıncı aletine bağlanmıştır. *Cuff* otomatik olarak şişirildikten sonra boşalma esnasında sistolik ve diyastolik kan

basıncı kaydedilmiştir. Her ölçüm beşer kez tekrarlanmış ve ölçümlerin ortalaması üzerinden analiz yapılmıştır.

### 2.2.3. İzole Organ Banyosu ile Damar Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi

Sakrifikasyondan yaklaşık 10 dak önce heparin injeksiyonu (3000 U/kg, i.p) yapılmış sıçanlar ketamin (90 mg/kg)/ksilazin (10 mg/kg, i.p) kombinasyonu ile anestezi edilmiş ve göğüs kafesleri açılarak torasik aortaları çıkarılmıştır. Daha önceden oksijenlendirilmiş soğuk Krebs-Henseleit (Krebs: NaCl 120, NaHCO<sub>3</sub> 25, Glukoz 10, KCl 4,8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, MgSO<sub>4</sub> 1,25, CaCl<sub>2</sub> 1,25 mmol/L) çözeltisi içinde endoteli hasar görmeyecek şekilde yağ ve bağ dokusundan temizlenerek (Şekil 2.3) 3-5 mm uzunluğunda halkalar şeklinde kesilip çelik teller aracılığıyla organ banyosuna (10 ml) asılmıştır (Şekil 2.4). Herhangi bir madde uygulanmadan önce organ banyosu içinde bir ucu izometrik *transducer*'a bağlanan dokular, ortama uyum sağlamaları için 2 g pasif gerim altında 1 sa inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda dokuların stabilizasyonu için damar preparatları bir kez izotonik KCl (60mM) ile kastedilmiştir. Yıkamadan sonra bazal gerime inen preparatlarda kümülatif olarak fenilefrin ( $10^{-9}$ - $10^{-4,5}$  M) ile konsantrasyon-yanıt eğrisi çıkarılmıştır. Bundan sonra dokular yıkanmış ve submaksimal fenilefrin konsantrasyonuyla (maksimum yanıtın %70-80'ini oluşturan) ön kasılma elde edilmiş ve sonra asetilkolin ( $10^{-9}$ - $10^{-4,5}$  M) ile endotel fonksiyonları değerlendirilmiştir. Sonrasında tekrar yıkanarak bazal gerime inen preparatlar, submaksimal fenilefrin konsantrasyonuyla kasılma elde edilmiş ve bazı kontrol ve diyabetik damarlarda ivabradinin endotele bağlı gevşetici etkisinin olup olmadığının incelenmesi için ivabradin ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) ile kümülatif olarak konsantrasyon-yanıt eğrisi oluşturulmuştur. İvabradinin gevşetici etkisine aracılık eden mekanizmaların tespit edilmesi için sağlıklı ve diyabetik damarlarda bazı inkübatörlerin varlığında ivabradinin konsantrasyon-yanıt eğrileri tekrar oluşturulmuştur. İvabradinin gevşetici etkisinin NO aracılı olup olmadığının değerlendirilmesi için bazı damarlar L-NAME ( $10^{-5}$  M) ile 30 dak inkübe edildikten sonra submaksimal fenilefrinle ön kasılma elde edilmiş ve ivabradin ile konsantrasyon-yanıt eğrisi oluşturulmuştur. Gevşetici etkiye  $\beta$ -AR'lerin katkısının

belirlenmesi amacıyla bazı damarlar  $\beta 1$  ve  $\beta 2$ -AR blokeri propranolol (PROP,  $10^{-5}$  M) ile inkübe edildikten sonra ivabradin ile konsantrasyon-yanıt eğrisi oluşturulmuştur. İvabradinin gevşetici etkisine  $K^+$  kanallarının katkısı olup olmadığının belirlenmesi için ise  $K^+$  kanal blokeri olan tetraetilamonyum klorür (TEA,  $10^{-4}$  M) varlığında ivabradinin konsantrasyon-yanıt eğrisi çıkarılmıştır. STZ-diyabet ve ivabradin tedavisinin izoprenalin ve sodyum nitroprusid (SNP) gevşeme yanıtlarına etkisini değerlendirmek için izoprenalin ( $10^{-9}$ - $10^{-4,5}$  M) ve SNP ( $10^{-11}$ - $10^{-6}$  M) ile konsantrasyon-yanıt eğrileri çıkarılmıştır. Organ banyosu çalışmalarından sonra damar preparatlarının uzunlukları ve ağırlıkları ölçülmüştür. Deney süresince perfüzyon sıvısının sıcaklığı sirkülatörlü su banyosu ile  $37^{\circ}\text{C}$ 'de, pH'sı ise %95  $\text{O}_2$  + %5  $\text{CO}_2$  gaz karışımı ile 7,4'te sabit tutulmuş ve veriler veri-kayıt sistemi ile kaydedilip sonrasında analizler yapılmıştır.



Şekil 2.3. Torasik Aortanın Yağ ve Bağ Dokusunun Temizlenmesi



**Şekil 2.4.** Torasik Aortanın Organ Banyosuna Asılması

#### 2.2.4. Histolojik İncelemeler

Sıçanların sakrifikasyonundan sonra her deney grubundan belirli sayıda sıçanın aort ve kalp dokuları %10'luk tamponlu ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve distile su pH:7) formaldehit solüsyonunda 24 sa bekletilerek tespit işlemi gerçekleştirilmiştir. Tespit işleminden sonra sırasıyla dokuların yıkama, suyunu giderme (dehidrasyon), saydamlaştırma, parlatma ve blokaj işlemleri ile doku takip prosedürü tamamlanmıştır. Parafinle blokajı yapılan aort ve kalp dokuları mikrotom cihazı yardımıyla 5  $\mu\text{m}$  kalınlığında kesilmiştir. Elde edilen kesitler su banyosu muamelesinden sonra üçlü boyama işlemi için rodajlı lamlara, floresan boyama işlemi için ise polilizin kaplı lamaların üzerine alınmıştır. Kesitler önce 30 dak oda sıcaklığında, daha sonrasında da 24 sa 37°C'lik etüvde bekletilerek kurutma işlemi tamamlanmıştır. Bu kesitlerde Crossman'ın üçlü boyaması ve floresan boyaması yapılmıştır. Aort ve kalp kesitlerinde floresan özellikteki DHE ile süperoksit, DAF-2DA boyaması ile NO yoğunlukları ölçülmüştür. Böylece kalp ve damardaki

süperoksit radikallerinin ve NO miktarlarının STZ-diyabet ve/veya ivabradin tedavisinden nasıl etkilendikleri belirlenmiştir (NOT: Tez önerisinde histolojik incelemelere ilişkin çalışmaların yapılacağı bildirilmemiş olmasına rağmen gerçekleştirilen histolojik incelemeler ve bu incelemelerin sonuçlarına tez çalışmasında yer verilmiştir).

#### **2.2.4.1. Crossman'ın Üçlü Boyaması**

Aort ve kalp dokularının etrafındaki parafinin saf ksilolle deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra kesitler sırasıyla %100, %96 %80, %70 etil alkol bulunan şalelerde üçer dak bekletilmiştir. Daha sonra beş dak distile suda yıkanan doku kesitleri sırasıyla *Weigert*'in demirli hematoksileni, asit fuksin ve anilin mavisi boyaları ile muamele edilmiştir. *Weigert*'in demirli hematoksilin boyası hücrelerin çekirdeklerini, asit fuksin boyası hücre sitoplazmasını ve anilin mavisi boyası bağ dokunun boyanması sağlamaktadır. Dokuların boyalardan arındırılması için kesitler sırayla %96, %100 etil alkole ve ardından da saf ksilole alınmıştır. Ksilolle bağdaşan bir kapatıcı ortam olan entellan kullanılarak doku kesitleri lamelle kapatılmış ve kurumaya bırakılmıştır (Crossmon, 1937). Kuruma işleminden sonra ışık mikroskopunda aort kesitlerinin fotoğrafları 40X, kalp kesitlerinin fotoğrafları ise 1,25X büyütme objektifle çekilmiştir. Sol ventrikül ve aort dokularının duvar kalınlıklarının ölçümü için Leica görüntü analiz sistemi (*Leica Image Analysis System (LAS)*) kullanılmıştır.

#### **2.2.4.2. DAF-2DA Boyaması**

Aort ve kalp kesitlerinde saf ksilolle deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra bu kesitler sırasıyla %100, %96 %80, %70 etil alkol bulunan şalelerde beşer dak bekletilmiştir. Kesitler beş dak distile suda bekletildikten sonra üç defa beş dak boyunca fosfat tamponu olan PBS (pH:7,4) ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra fikse edilmiş olan hücrelerin membran geçirgenliğini

(permeabilizasyonunu) sağlamak için kesitler %0,2'lik PBS-Triton ile oda sıcaklığında 10 dak muamele edilmiştir. Ardından dokular üç defa beş dak süreyle PBS ile yıkanmıştır. Hidrofobik doku sınırlandırma kalemı ile etrafı sınırlandırılan ve nemli bir kap içerisinde bulunan doku kesitlerinin üzerine karanlık ortamda 10  $\mu\text{mol/ml}$  DAF-2DA floresan boyası eklenmiş ve kesitler 37°C'lik etüvde 90 dak bekletilmiştir (Koyama ve ark., 2002). Daha sonra fazla boyanın uzaklaştırılması için kesitler yine karanlık ortamda üç defa beş dak süreyle PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin çekirdeklerini boyamak için karşıt boya maddesi olarak bilinen floresan özellikteki DAPI boyaması (30 saniye) yapılmış ve fazla boya uzaklaştırılmıştır. Kesitler distile suda beş dak bekletildikten sonra suyla bağdaşan ve floresan ışımının solmasını engelleyen bir kapatıcı ortam (*fluoroshield mounting medium*) kullanılarak kesitlerin üzeri lamelle kapatılmış ve kuruması için bekletilmiştir. Aort ve kalp kesitlerinin fotoğrafları 40X büyütme objektif kullanılarak floresan mikroskopunda çekilmiştir. Aort damar duvarındaki ve kalp kası hücrelerindeki NO miktarlarının ölçümü LAS ile yapılmıştır.

#### **2.2.4.3. DHE Boyaması**

Aort ve kalp kesitlerinin yıkama ve fikse etme işlemleri gerçekleştirildikten sonra kesitlere karanlık ortamda 20  $\mu\text{mol/ml}$  DHE floresan boyası eklenmiş ve kesitler 37°C'lik etüvde 75 dak bekletilmiştir (Gil-Ortega ve ark., 2014). Kesitlerdeki fazla boya uzaklaştırılmış ve kesitlerin kuruması sağlanmıştır. Aort ve kalp kesitlerinin fotoğrafları 40X büyütme objektif kullanılarak floresan mikroskopunda çekilmiştir. Aort damar duvarındaki ve kalp kası hücrelerindeki süper oksitler radikallerinin ölçümü LAS ile yapılmıştır.

#### **2.2.5. Biyokimyasal İncelemeler**

Deney hayvanlarının sakrifiye edilmeleri sırasında toplanan kanlar iki ayrı santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Kan örneklerinden plazma elde etmek için

antikoagülan bir madde olan EDTA içeren tüplere kan aktarılmıştır. Serum elde etmek için ise herhangi bir madde içermeyen tüplere alınan kanlar 15 dak 1800 g'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen plazma ve serumlarda antioksidan özellikte bir enzim olan SOD aktivitesi, plazma örneklerinde ise p-selektin ve VCAM-1 seviyeleri ölçülmüştür. Bu ölçümler sıçan plazma ve serumunda ölçüm yapmaya elverişli standart kitler yardımıyla gerçekleştirilmiştir. SOD ölçümü ise kolorimetrik ölçüm yöntemine dayanan bir kit yardımıyla spektrofotometrik olarak yapılmıştır VCAM-1 ve p-selektin ölçümleri antijen-antikor etkileşmesi esasına dayanan ELISA kitleri yardımıyla spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir.

#### 2.2.6. Western Blot

Sıvı nitrojen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) ile dondurulan ve  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan dokular sıvı nitrojen ile toz edilerek içinde RIPA, fosfataz inhibitörü ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 200 nM) ve PİK, (1:100) bulunan tüplere alınmıştır. Dokular ultrasonik homojenizatör ile homojenize edildikten sonra  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 2 sa çalkalanmıştır.  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 16 000 g'de 30 dak santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrılmış ve sonraki analizler için  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında ise hücrelerin homojenizasyon işlemi için hücreler kültür plaklarındaki kuyulardan kazıyıcı (*cell scraper*) yardımı ile kaldırılmış, pipetaj yapılarak parçalanmaları sağlanmıştır. Bu işlemin sonrasında  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 16 000 g'de 30 dak santrifüj edildikten sonra süpernatant ayrılmıştır. Bu lizatların protein miktar tayinleri kolorimetrik esasa dayanan BCA yöntemi ile yapılmıştır.

Örnek lizatları ve denatürasyon çözeltisinin (*Laemmli Sample Buffer*) karışımı jele yüklenecek her örnekte eşit miktarda protein olacak şekilde hazırlanmıştır. Denatürasyonun gerçekleşmesi için örnekler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dak bekletilmiştir.

SDS jel elektroforezi için, lizat ve denatürasyon çözeltisinin karışımı, incelenecek proteinin molekül ağırlığına uygun olarak %8, %10 ya da %15 konsantrasyonlarda hazırlanmış poliakrilamid jele yüklenmiştir. Elektroforezde kullanılan jeller iki aşamada hazırlanmaktadır. Örneklerin yüklendiği yükleme jeli

iken örneklerin moleköl ağırlıklarına göre ayrıldığı jel ise ayırıcı jeldir. Ayırıcı ve yükleme jellerinin formülasyonları sırasıyla Çizelge 2.5'te ve Çizelge 2.6.'da gösterilmiştir.

**Çizelge 2.5.** Ayırıcı Jel Formülasyonu

|                                   | Ayırıcı jel (1,5 mm) (2 jel için) |          |          |
|-----------------------------------|-----------------------------------|----------|----------|
|                                   | %8 (ml)                           | %10 (ml) | %15 (ml) |
| Bidistile su                      | 10,20                             | 8,74     | 4,94     |
| Gliserol                          | 0,56                              | 0,56     | 0,56     |
| Tris.SDS (1,5 M, pH: 8,8)         | 5,63                              | 5,63     | 5,63     |
| Akrilamid/bisakrilamid (%30:%0,8) | 6,00                              | 7,50     | 11,25    |
| APS (%10)                         | 0,11                              | 0,11     | 0,11     |
| TEMED                             | 0,01                              | 0,01     | 0,01     |

**Çizelge 2.6.** Yükleme Jel Formülasyonu

|                                   | Yükleme jeli %4-5 (1,5 mm) (2 jel için) (ml) |
|-----------------------------------|----------------------------------------------|
| Bidistile su                      | 5,895                                        |
| Tris.SDS (1,5 M, pH: 6,8)         | 2,34750                                      |
| Akrilamid/bisakrilamid (%30:%0,8) | 1,03125                                      |
| APS (%10)                         | 0,09375                                      |
| TEMED                             | 0,00938                                      |

Elektroforez ile örnekler jel üzerinde moleköl ağırlıklarına göre ayrılmış ve sonrasında antikorla muamele edilmeye elverişli PVDF ya da nitroselölöz membranlara transfer edilmiştir. Membranlar spesifik olmayan antikor bağlanmalarını en aza indirmek için % 3-5 BSA ya da yağsız süt tozu içeren tampon çözeltide (TBS-Tween20 (TBS-T)) çalkalanarak 1 sa bekletilmiş (bloklama işlemi) ve sonrasında yıkanmıştır. Membranlar, primer antikorla üretici firma önerileri doğrultusunda %5 BSA içeren TBS-T tampon çözeltisinde 1/500, 1/750 ya da 1/1000 konsantrasyonda gece boyunca +4°C'de çalkalanmıştır. İnkübasyon ve rutin yıkama

işlemleri sonrasında membranlar bu kez primer antikora uygun sekonder antikora 1 sa inkübe edilmiştir. Yıkanan membranlar ECL reaktif karışımı 1-2 dak muamele edilmiş ve kaset içinde karanlık odada röntgen filmine basılmıştır. Filmde görüntünün oluşmasından sonra filmler yıkanmış (*developer/fixer* muamelesi), kurutulan filmdeki görüntüler taranarak Image J® programı yardımıyla analiz edilmiştir.

Çizelge 2.7.'de Western blot ile incelenen proteinler ve çalışmanın gerçekleştirildiği dokular gösterilmiştir.

**Çizelge 2.7.** Western Blot ile İncelenen Proteinler ve İncelendikleri Dokular

| Sıçan        |        | Hücre        |      |
|--------------|--------|--------------|------|
| Aort         | Kalp   | HUVEC        | H9c2 |
| HCN1-4       | HCN1-4 | HCN1-4       | ANP  |
| eNOS, p-eNOS | ANP    | eNOS, p-eNOS |      |
| Akt, p-Akt   |        |              |      |

Western blot çalışmaları ile;

- Kalpte STZ-diyabet ve ivabradin tedavisinin HCN izoformları ve ANP protein miktarı üzerine etkisi,
- Aortta HCN izoformlarının varlığının belirlenmesi, STZ-diyabet ve ivabradin tedavisinin eNOS ve Akt proteininin fosforilasyonlarına etkisi,
- HUVEC'lerde eNOS proteinin fosforilasyonu ve HCN izoformlarının varlığı,
- H9c2 hücrelerde ANP proteinin tayini ile ivabradinin antihipertrofik etkisi araştırılmıştır.

### 2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

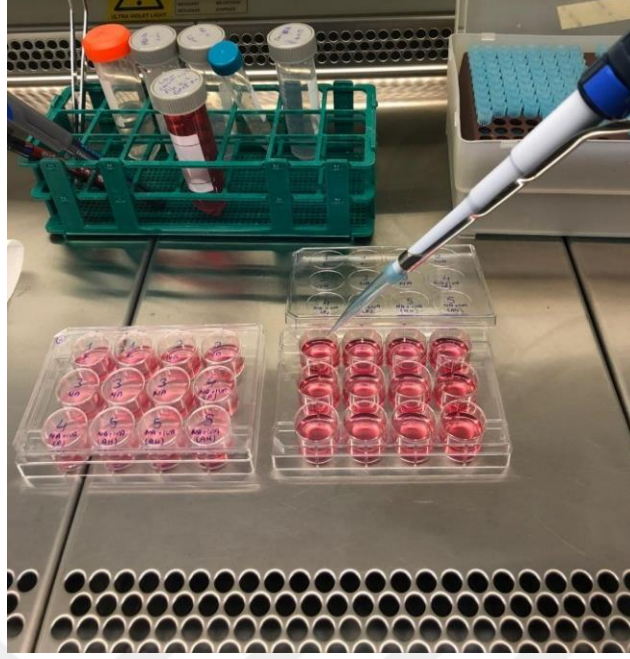
Hücreler, üretici firmanın önerileri doğrultusunda %10 (v/v) serum, 100 U/ml penisilin G ve 100 µg/ml streptomisin içeren ve bu hücreler için optimize edilmiş ortamda (yüksek ya da düşük glukozlu DMEM) ve 25 cm<sup>2</sup> yüzey alanına sahip plastik flasklarda 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'lik etüvde inkübe edilmiştir. Yüzeye tutunma özelliğinde olan hücrelerin çoğaltılması ve pasajlama işlemi için flasktaki kullanılmış besiyeri dökülmüş, hücrelerin yüzeyden kaldırılması için 0,4 ml tripsin eklenmiş ve bu işlem iki kez gerçekleştirilmiştir. Daha sonra yüzeye yapışan hücrelerin kalkması için flasklar etüvde 3-4 dak bekletilerek hücreler flask yüzeyinden ayrılmıştır. Yeni flaska aktarılan hücrelere taze besiyeri eklenmiştir. Hücre pasajı laminar akımlı kabinde steril olarak gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları iki ayrı hücre hattında yapılmıştır.

#### 2.3.1. HUVEC'lerde Gerçekleştirilen Çalışmalar

Hücreler 12 kuyulu kültür plağına, her kuyuya eşit sayıda hücre gelecek şekilde antibiyotik içermeyen besiyeri ile ekilmiş (Şekil 2.5) ve 24 sa boyunca bu besiyerinde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda hücrelere ivabradin (3 µM) ve/veya L-NAME (100 µM) (30 dak) uygulanmıştır. Daha sonra hücreler PBS ile yıkanmış ve RIPA ile parçalanmıştır (lisis). BCA yöntemi ile protein miktar tayinleri yapılmış ve örnekler Western blot protokolüne hazır hale getirilmişlerdir.

HUVEC'lerde gerçekleştirilen çalışmalar:

- HCN izoformlarının miktar tayini
- eNOS ve p-eNOS miktar tayini



**Şekil 2.5.** Laminar Akımlı Kabinde Hücrelerin Kültür Plağına Bölünmesi

HUVEC’lerde oluşturulan deney grupları:

**Grup 1:** Kontrol grubu (K),

**Grup 2:** İvabradin uygulanan grup (I)

**Grup 3:** L-NAME uygulanan grup (L)

**Grup 4:** L-NAME ve ivabradinin birlikte uygulandığı grup (LI)

### 2.3.2. H9c2 Hücrelerde Gerçekleştirilen Çalışmalar

H9c2 hücreler 12 kuyulu kültür plağına her kuyuya eşit sayıda hücre gelecek şekilde antibiyotik içermeyen besiyeri ile ekilmiş ve 24 sa boyunca bu besiyerinde bekletilmiştir. Noradrenalin uygulaması (48 sa) ile hipertrofi modeli oluşturulmuştur. Noradrenalin (5  $\mu$ M) ile birlikte ve noradrenalinden 24 sa sonra ivabradin (5  $\mu$ M) uygulaması yapılan farklı deney grupları oluşturulmuştur. Böylece ivabradin tedavisinin hem protektif hem de antihipertrofik etkisi araştırılmıştır. Deneysel hipertrofi, ANP *marker* proteini ve morfolojik incelemelerle karakterize edilmiştir.

Morfolojik incelemeler noradrenalin uygulamasından 24 ve 48 sa sonra mikroskopta alınan görüntülerinin Image J® programı kullanılarak analiz edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Hipertrofi modelinin oluşmasından sonra hücreler PBS ile yıkanmış ve RIPA ile parçalanmıştır. BCA yöntemi ile protein miktar tayinleri yapılmış ve örnekler Western blot protokolüne hazır hale getirilmişlerdir.

H9c2 hücrelerde oluşturulan deney grupları:

**Grup 1:** Kontrol grubu (K),

**Grup 2:** İvabradin uygulanan grup (IVA)

**Grup 3:** Noradrenalin ile hipertrofi modeli oluşturulan grup (NA)

**Grup 4:** Noradrenalin ve ivabradinin birlikte uygulandığı grup (PRO), protektif etki grubu (48 sa ivabradin inkübasyonu yapılmış)

**Grup 5:** Noradrenalin 24 sa sonra ivabradin uygulanan grup (AH), antihipertrofik etki grubu (24 sa ivabradin inkübasyonu yapılmış)

## 2.4. İstatistiksel Analizler

Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak belirtilmiştir. Grafiklerin oluşturulması ve istatistiksel analizler için GraphPad Prism5® programı kullanılmıştır. Çoklu kıyaslarda tek-yönlü (*One-WAY*) ANOVA ve ardından post-hoc Bonferroni analizi yapılmıştır. Konsantrasyon-yanıt eğrilerinin anlamlılık düzeylerini belirlemek için iki yönlü (*Two-WAY*) ANOVA analizi gerçekleştirilmiştir. Anlamlılık düzeyleri (p) aşağıdaki gibi belirtilmiştir:

\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,0001$

## 2.5. Yazım ve Grafiklerin Oluşturulması

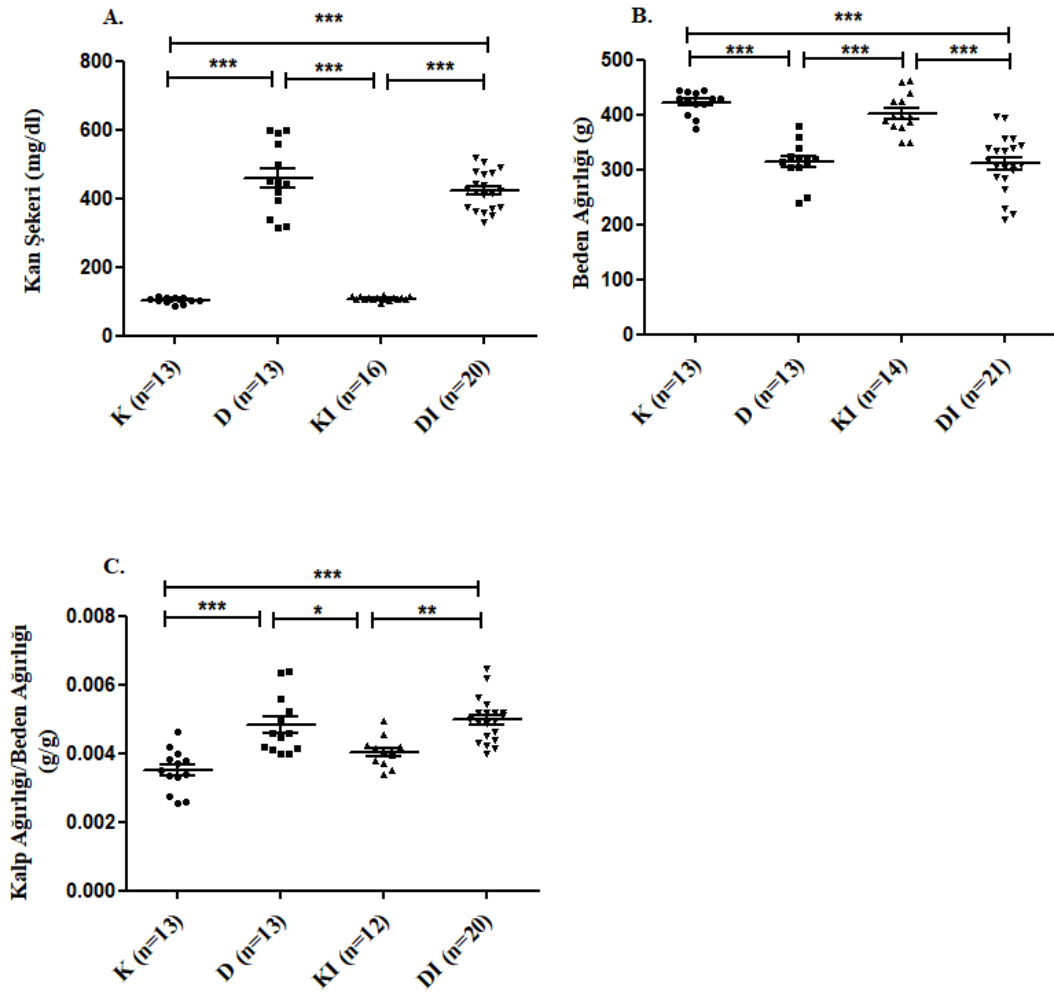
Bu tez çalışmasının yazımında Microsoft Office® Word programı kullanılmıştır. Kaynakların dzenlenmesinde EndNote® (Sürüm 8), grafiklerin çiziminde GraphPad Prism5® ve görüntülerin analiz edilmesinde Image J® programları kullanılmıştır.



### 3. BULGULAR

#### 3.1. Sıçanların Genel Özellikleri

Sıçanların genel özelliklerini değerlendirmek için her deney grubunun kan şekerleri ve beden ağırlıkları düzenli aralıklarla ölçülmüştür. Şekil 3.1.'de STZ-diyabetin ve kronik ivabradin tedavisinin sıçanların genel özellikleri üzerine etkisi ölüm anında ölçülen parametreler üzerinden gösterilmektedir. Beklendiği gibi STZ-diyabetik sıçanların kan şekerleri kontrol grubuna kıyasla belirgin bir şekilde yüksek çıkmıştır ve ivabradin tedavisinin kan şekeri üzerinde etkisinin olmadığı bulunmuştur (Şekil 3.1A). Benzer şekilde ölüm anında sıçanların beden ağırlıkları ölçülmüştür. Diyabetik hayvanların beden ağırlıkları kontrole göre azalmış ve ivabradin tedavisi kontrol ve diyabetik sıçanların beden ağırlığını değiştirmemiştir (Şekil 3.1B). Kalpte hipertrofi göstergelerinden biri olan kalp ağırlığının beden ağırlığına oranı ölçülmüş, bu oranın STZ-diyabetik sıçanlarda kontrole göre daha yüksek olduğu ve ivabradin tedavisinin diyabetik sıçanlardaki bu artışı düzeltmediği bulunmuştur (Şekil 3.1C).



**Şekil 3.1.** Sıçanların Genel Özellikleri

Deney gruplarının ölüm anında ölçülen kan şekerleri (A); beden ağırlıkları (B); kalp ağırlığı/beden ağırlığı oranları (C). Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında parantez içinde belirtilmiştir.

### 3.2. STZ-Diyabet ve İvabradinin Kan Basıncı ve Kalp Atım Hızı Üzerine Etkisi

Dört deney grubunun kan basıncı ve kalp atım hızı parametreleri tedavinin 1. ve 3. haftalarında ölçülmüştür. İvabradin tedavisi 1. haftada yalnızca diyabetik sıçanların kalp atım hızını kontrole kıyasla azaltmış, kontrol sıçanların kalp atım hızını değiştirmemiştir. Tedavinin 1. haftasında sistolik, diyastolik ve ortalama arter basıncı açısından gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir. İlginç olarak, tedavinin 3. haftasında ivabradin tedavili diyabetik sıçanların sistolik, diyastolik ve ortalama arter basıncı değerlerinin hem kontrol hem de diyabetik gruplara kıyasla daha düşük

olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ivabradin tedavili diyabetik sıçanlarda tedavinin 3. haftasında kalp atım hızı kontrol ve diyabetik gruba göre daha düşüktür. Beklendiği gibi 1. ve 3. haftada diyabetik sıçanların kalp atım hızları kontrole göre daha düşük çıkmıştır. İvabradin tedavisi kontrol sıçanların kalp atım hızını 1. ya da 3. haftalarda değiştirmemiştir (Çizelge 3.1).

**Çizelge 3.1.** Tedavinin 1. ve 3. Haftalarındaki Kan Basıncı ve Kalp Atım Hızı Değerleri (Hemodinamik Ölçümler)

|                               | Tedavinin 1. Haftası    |                          |                        |                           | Tedavinin 3. Haftası   |                          |                         |                                 |
|-------------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------|
|                               | K                       | D                        | KI                     | DI                        | K                      | D                        | KI                      | DI                              |
| <b>Sistolik Kan Basıncı</b>   | 151,90±<br>1,71<br>n=3  | 144,90±<br>8,96<br>n=4   | 155,00±<br>6,02<br>n=5 | 139,40±<br>3,65<br>n=8    | 167,40<br>±1,34<br>n=5 | 167,50±<br>4,81<br>n=6   | 154,80<br>±4,57<br>n=6  | 126,60±<br>5,41*,&<br>#<br>n=10 |
| <b>Diastolik Kan Basıncı</b>  | 137,70±<br>1,82<br>n=3  | 113,90±<br>10,59<br>n=4  | 135,20±<br>4,67<br>n=5 | 116,00±<br>3,76<br>n=8    | 143,80<br>±2,59<br>n=5 | 149,30±<br>3,25<br>n=6   | 131,50<br>±3,54#<br>n=6 | 112,20±3<br>,19*,&,#<br>n=10    |
| <b>Ortalama Arter Basıncı</b> | 145,00±<br>0,99<br>n=3  | 143,40±<br>6,36<br>n=4   | 145,10±<br>5,12<br>n=5 | 128,40±<br>4,13<br>n=8    | 154,30<br>±1,25<br>n=5 | 159,00±<br>4,52<br>n=6   | 142,70<br>±3,58<br>n=6  | 121,80±4<br>,50 *,&,#<br>n=10   |
| <b>Kalp Atım Hızı</b>         | 368,20±<br>25,34<br>n=3 | 279,00±<br>16,66*<br>n=4 | 329,30±<br>9,86<br>n=5 | 264,00±<br>7,67*,&<br>n=8 | 364,90<br>±6,38<br>n=5 | 328,90±<br>11,86*<br>n=6 | 367,80<br>±8,85#<br>n=6 | 271,50±5<br>,97*,&,#<br>n=10    |

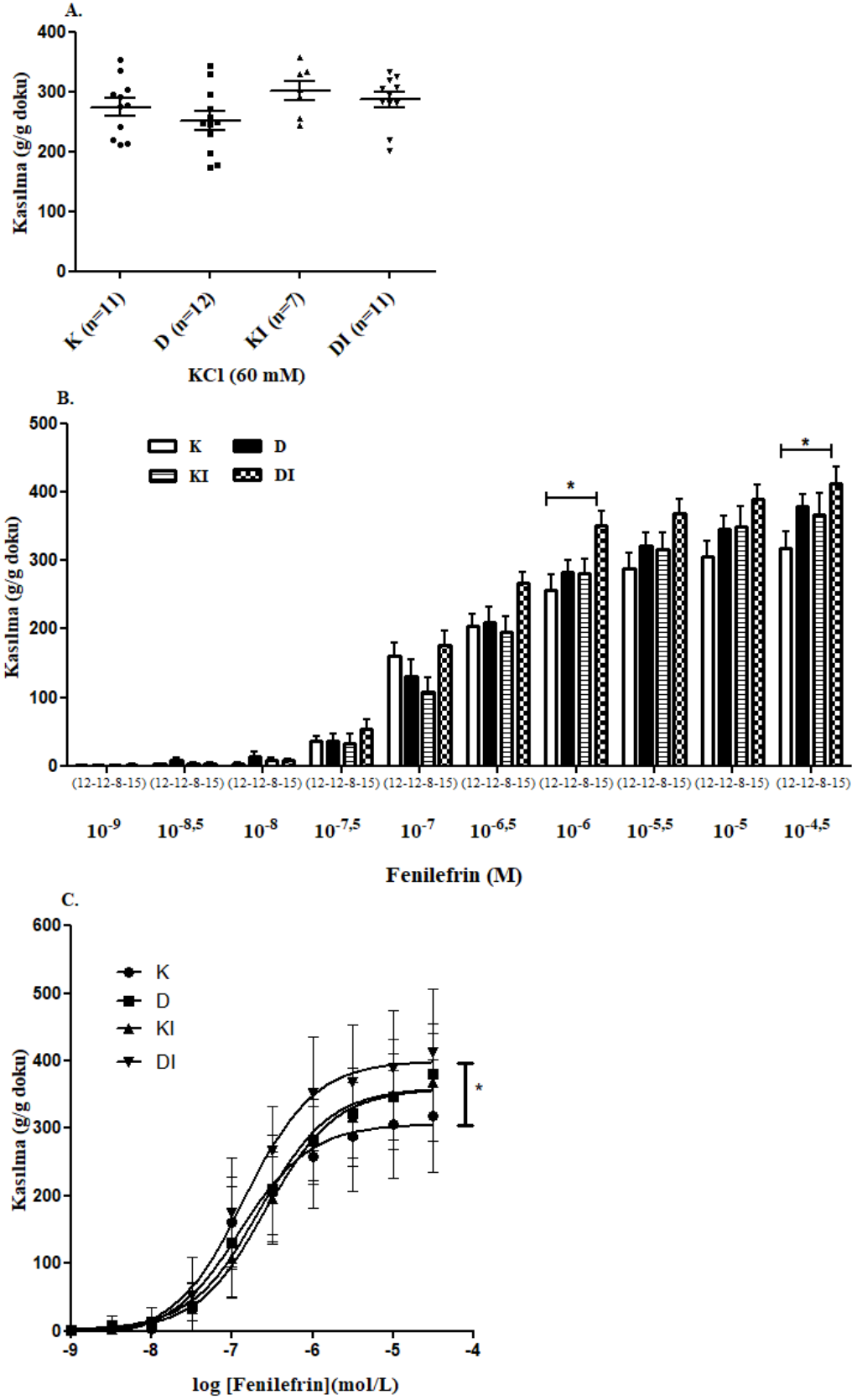
\* K'ya göre anlamlılık; # D'ye göre anlamlılık; & KI'ya göre anlamlılık. Her grubun ortalama değerleri ve standart hataları gösterilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı ölçüm değerlerinin altında belirtilmiştir.

### 3.3. STZ-Diyabet ve İvabradinin Aort Kasılma Yanıtları Üzerine Etkileri

İzole organ banyosu çalışmalarıyla tüm deney gruplarının torasik aortasında kasılma fonksiyonları değerlendirilmiştir. Bunun için damar preparatları tek doz izotonik KCl (60 mM) (Şekil 3.2A) ile kastrılmış ve yıkamadan sonra bazal gerime inen preparatlarda kümülatif olarak fenilefrin ( $10^{-9}$ - $10^{-4,5}$  M) ile konsantrasyon-yanıt eğrisi çıkarılmıştır (Şekil 3.2B). Fenilefrin kasılmalarının konsantrasyon-yanıt

eğrileri arasındaki farklılıklar da belirtilmiştir (Şekil 3.2C). Kasılma yanıtları doku ağırlığı başına kasılma değerleri kaydedilerek ölçülmüştür. Bu sonuçlar incelendiğinde KCl kasılmalarının gruplar arasında benzer olduğu gözlenmiştir. Fenilefrin ile elde edilmiş kasılma yanıtları incelendiğinde ise diyabetik grupta kontrole kıyasla kasılma yanıtlarında artma eğilimi gözlenmiştir. Ayrıca fenilefrininin yüksek konsantrasyonlarında ivabradin tedavili diyabetik damarlarda fenilefrin kasılmaların kontrole kıyasla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 3.2.'de fenilefrin kasılmasının maksimum etkinin %50'sini oluşturan konsantrasyonun negatif logaritması ( $pEC_{50}$ ) ve maksimum etki ( $E_{max}$ ) değerleri tablo halinde gösterilmektedir.





**Şekil 3.2.** Torasik Aortanın Kasılma Yanıtları  
KCl (60 mM) (A); Fenilefrin ( $10^{-9}$ - $10^{-4,5}$  M) (B) ile elde edilen kasılma yanıtları; . Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında parantez içinde belirtilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Fenilefrin ile Elde Edilen Kasılma Yanıtlarının pEC<sub>50</sub> ve Emax Değerleri

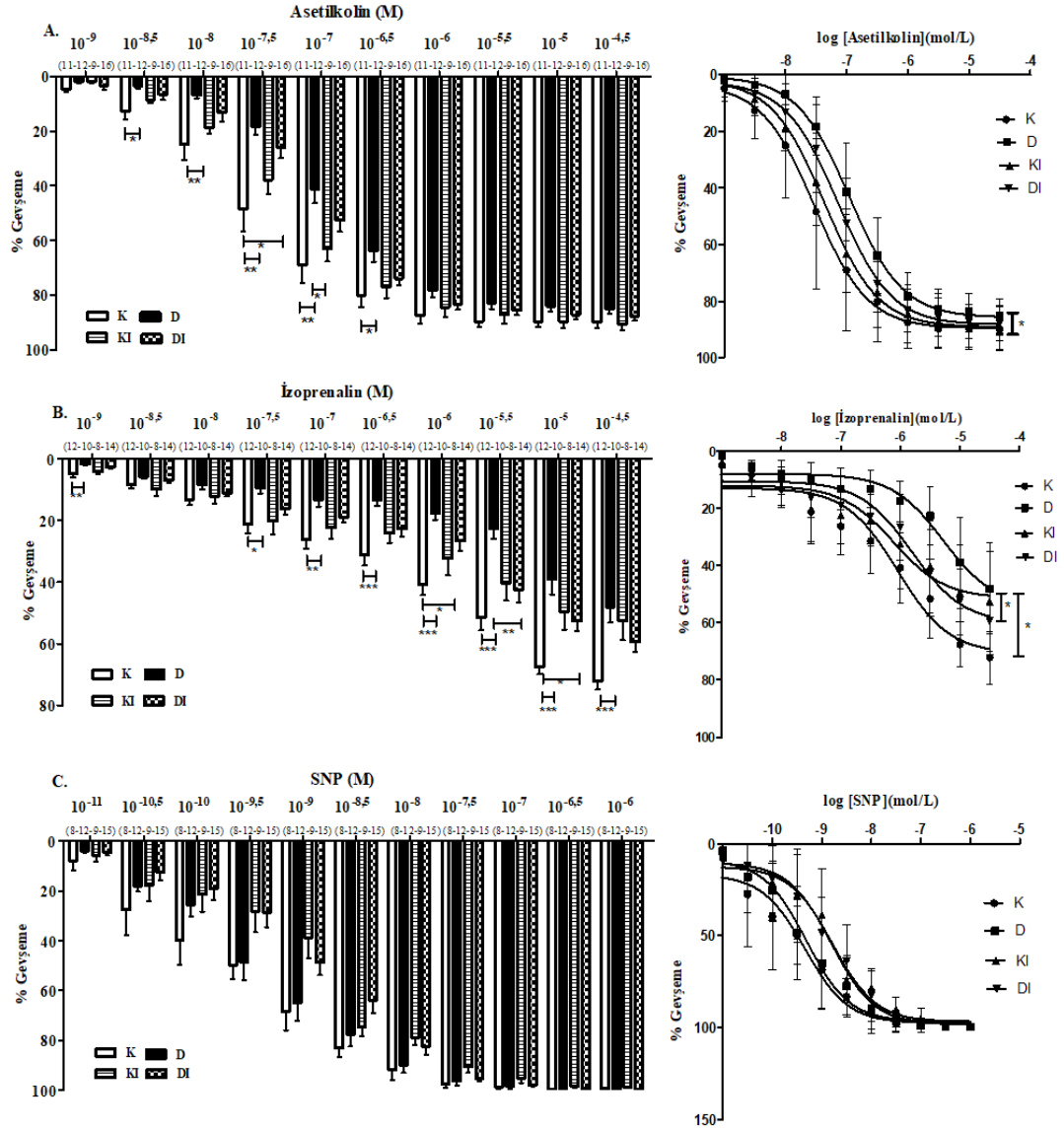
|           | pEC <sub>50</sub> | Emax (g/g doku)     |
|-----------|-------------------|---------------------|
| <b>K</b>  | 6,90±0,09 (n=12)  | 306,00±9,69 (n=12)  |
| <b>D</b>  | 6,65±0,07 (n=12)  | 359,30±9,89 (n=12)  |
| <b>KI</b> | 6,59±0,09 (n=8)   | 358,10±12,30 (n=8)  |
| <b>DI</b> | 6,85±0,07 (n=15)  | 399,30*±9,87 (n=15) |

\* K'ya göre anlamlılık.

### 3.4. STZ-Diyabet ve İvabradinin Aort Gevşeme Yanıtları Üzerine Etkileri

İzole organ banyosu çalışmaları ile tüm deney gruplarının torasik aortasının gevşeme yanıtları değerlendirilmiştir. Bunun için damar preparatları submaksimal fenilefrin konsantrasyonu ile ön kasılma elde edilmiş, ardından asetilkolin ( $10^{-9}$ - $10^{-4,5}$  M) ile endotel bağımlı gevşeme yanıtları elde edilmiştir (Şekil 3.3A). STZ-diyabetin ve ivabradinin endotel bağımsız gevşeme yanıtlarını değerlendirmek için submaksimal fenilefrin konsantrasyonu ile ön kasılma elde edilmiş damar preparatlarında sırasıyla izoprenalin ( $10^{-9}$ - $10^{-4,5}$  M, Şekil 3.3B) ve SNP ( $10^{-11}$ - $10^{-6}$  M, Şekil 3.3C) ile konsantrasyon-yanıt eğrileri çıkarılmıştır. Asetilkolin, izoprenalin ve SNP ile elde edilen gevşemelerin konsantrasyon-yanıt eğrileri arasındaki farklılıklar da belirtilmiştir. Gevşeme yanıtları fenilefrin kastırılmasından sonra % gevşeme olarak gösterilmiştir. Asetilkolinin çoğu konsantrasyonunda endotel bağımlı gevşeme yanıtları diyabetik damarlarda kontrole kıyasla daha az bulunmuştur. Asetilkolinin düşük konsantrasyonlarında ivabradin tedavili diyabetik damarlarda gevşeme yanıtları kontrole kıyasla daha az olsa da, çoğu konsantrasyonda ivabradin tedavili diyabetik damarlar ile kontrol grubunun gevşeme yanıtlarının benzer olması ivabradinin diyabetik damarlarda bozulmuş olan endotel bağımlı gevşeme yanıtlarını iyileştirme eğilimi olduğunu göstermektedir. Diyabetik damarlarda izoprenalinin çoğu konsantrasyonunda elde edilen gevşeme yanıtları kontrollere göre daha düşüktür. İvabradin tedavili diyabetik damarlar ile kontrol damarların izoprenalin gevşeme yanıtlarının benzer olması, ivabradinin diyabette bozulmuş olan endotel bağımsız gevşemeleri (izoprenalin gevşemeleri) iyileştirme eğilimi olduğunu

göstermektedir. SNP ile elde edilen gevşemeler ise gruplar arası farklılık göstermemektedir. Çizelge 3.3.'te asetilkolin, izoprenalin ve SNP gevşemelerinin pEC<sub>50</sub> ve Emax değerleri tablo halinde gösterilmektedir.



**Şekil 3.3.** Torasik Aortada Asetilkolin, İzoprenalin ve SNP ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları

Asetilkolin (10<sup>-9</sup>-10<sup>-4.5</sup> M) (A); İzoprenalin (10<sup>-9</sup>-10<sup>-4.5</sup> M) (B); SNP (10<sup>-11</sup>-10<sup>-6</sup> M) ile elde edilen gevşeme yanıtları. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında parantez içinde belirtilmiştir.

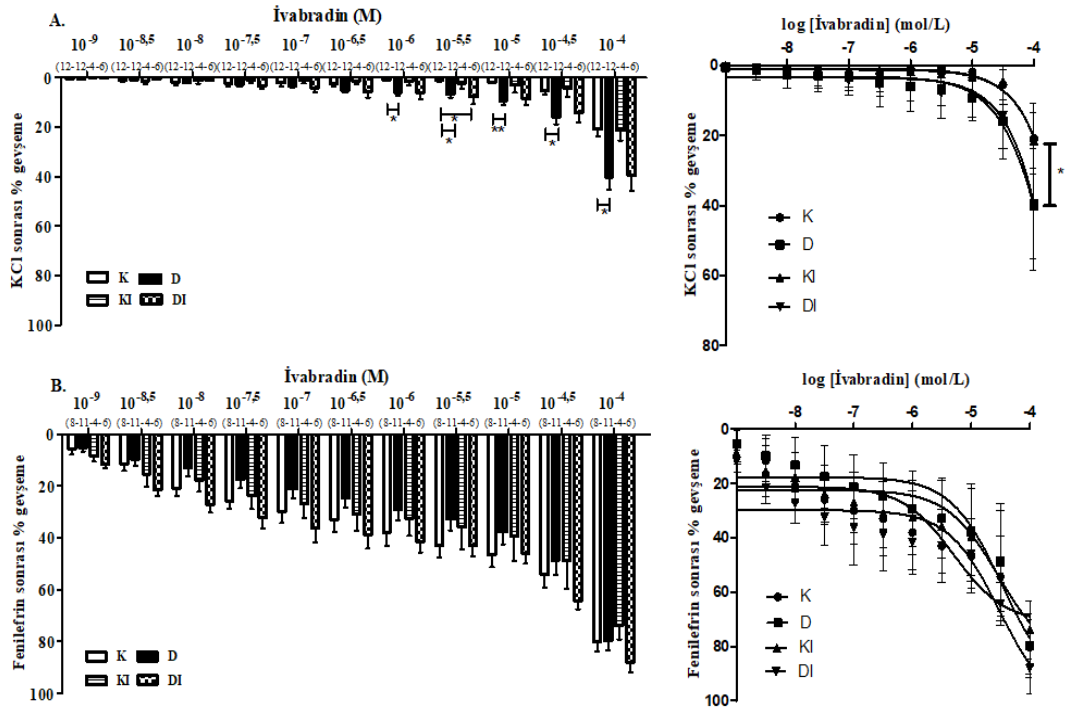
**Çizelge 3.3.** Asetilkolin, İzoprenalin ve SNP ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtlarının pEC<sub>50</sub> ve Emax Değerleri

|           | Asetilkolin          |                      | İzoprenalin          |                       | SNP                 |                      |
|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
|           | pEC <sub>50</sub>    | Emax                 | pEC <sub>50</sub>    | Emax                  | pEC <sub>50</sub>   | Emax                 |
| <b>K</b>  | 7,52±0,09<br>(n=11)  | 89,58±2,05<br>(n=11) | 6,04±0,09<br>(n=12)  | 70,79±2,51<br>(n=12)  | 9,34±0,12<br>(n=8)  | 97,49±2,52<br>(n=8)  |
| <b>D</b>  | 6,95±0,05*<br>(n=12) | 85,76±1,42<br>(n=12) | 5,28±0,15*<br>(n=10) | 54,62±4,77*<br>(n=10) | 9,31±0,07<br>(n=12) | 96,73±1,80<br>(n=12) |
| <b>KI</b> | 7,36±0,06<br>(n=9)   | 89,14±1,56<br>(n=9)  | 6,12±0,19<br>(n=8)   | 51,45±3,46<br>(n=8)   | 8,78±0,09<br>(n=9)  | 96,77±2,56<br>(n=9)  |
| <b>DI</b> | 7,14±0,05<br>(n=16)  | 88,35±1,34<br>(n=16) | 5,80±0,10<br>(n=14)  | 60,15±2,61<br>(n=14)  | 8,84±0,06<br>(n=15) | 98,35±1,82<br>(n=15) |

\*K'ya göre anlamlılık.

### 3.5. İvabradinin Damar Gevşetici Etkisinin Değerlendirilmesi ve Mekanizmasının Aydınlatılması

İzotonik KCl (60 mM) (Şekil 3.4A) ve submaksimal fenilefrin konsantrasyonu ile ön kasılma elde edilmiş damar preparatlarında (Şekil 3.4B) ivabradininin damar gevşetici etkisi değerlendirilmiştir. Bunun için KCl ve fenilefrin ile ön kasılma elde edilmiş damar preparatlarında ivabradin ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) ile kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrisi çıkarılmıştır. İvabradin ile elde edilen gevşemelerin konsantrasyon-yanıt eğrileri arasındaki farklılıklar da belirtilmiştir. KCl ile ön kasılma elde edilmiş damarlarda ivabradin her grupta gevşeme yanıtı oluşturmuştur. İvabradin gevşeme yanıtının diyabetik damarlarda kontrole kıyasla daha fazla olduğu bulunmuş ve ivabradinin bazı konsantrasyonlarında bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Fenilefrin ile ön kasılma elde edilmiş damarlarda da ivabradin tüm gruplarda belirgin gevşeme oluşturmuştur. Gevşeme yanıtları açısından gruplar arasında farklılık olmadığı gözlenmiştir.

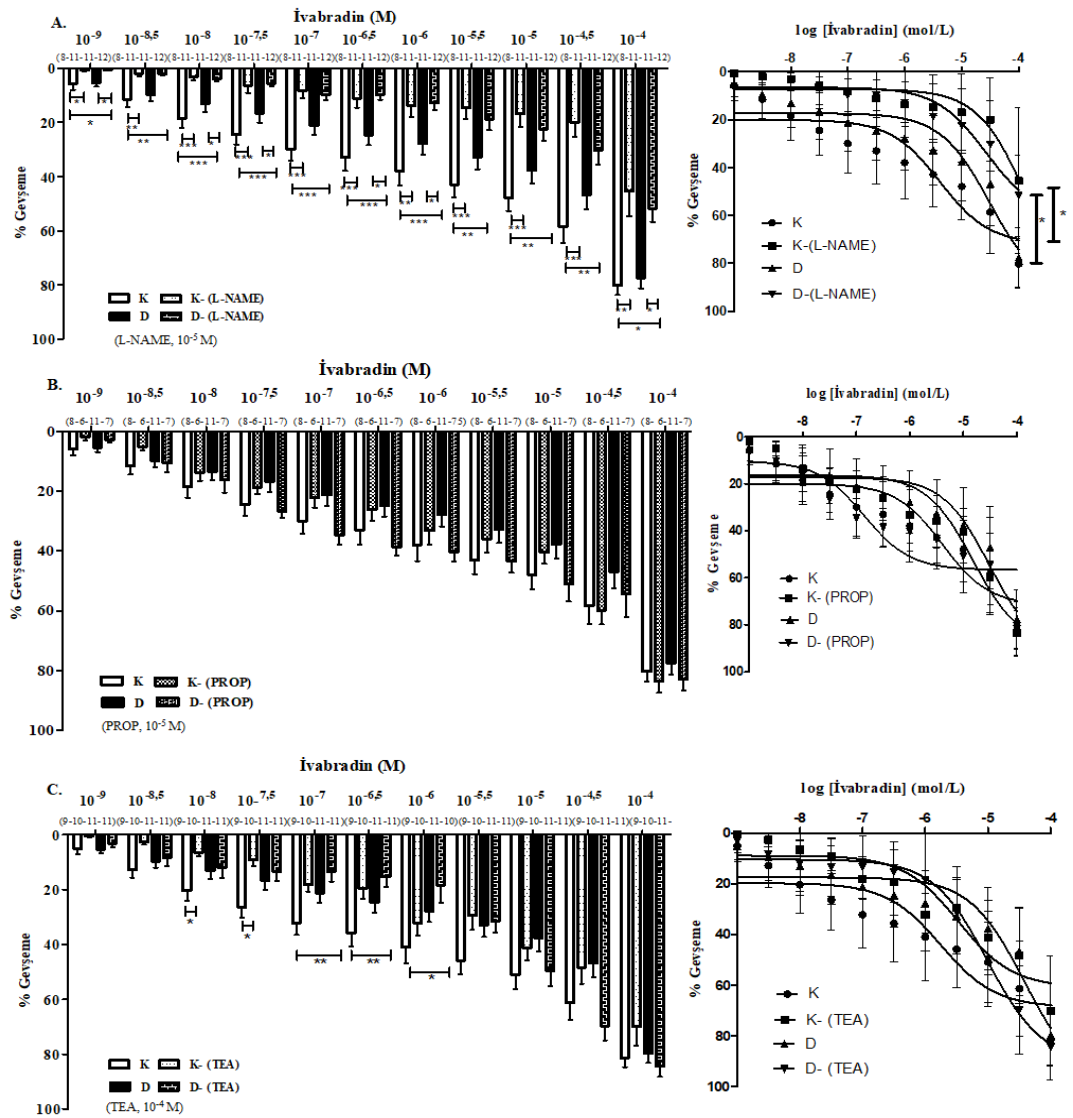


**Şekil 3.4.** Torasik Aortada İvabradin ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtları

KCl ile ön kasılma elde edilmiş damarlarda ivabradinin ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) gevşeme yanıtları (A); Fenilefrin ile ön kasılma elde edilmiş damarlarda ivabradinin ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) gevşeme yanıtları (B). Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında parantez içinde belirtilmiştir.

İvabradinin gevşetici etkisinin NO aracılı olup olmadığının tespit edilmesi için bazı kontrol ve diyabetik damarlar L-NAME ( $10^{-5}$  M) ile 30 dak inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda damarlar submaksimal fenilefrin konsantrasyonu ile ön kasılma elde edilmiş ve ivabradin ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) ile kümülatif konsantrasyon-yanıt eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 3.5A). Gevşetici etkiye  $\beta$ -AR'lerin katkısının belirlenmesi amacıyla bazı kontrol ve diyabetik damarlar PROP ( $10^{-5}$  M) ile 30 dak inkübe edilmiştir. Fenilefrin ile ön kasılma elde edilmiş damarlarda ivabradin ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) ile konsantrasyon-yanıt eğrisi çıkarılmıştır (Şekil 3.5B). Son olarak ivabradinin gevşetici etkisine K<sup>+</sup> kanallarının aracılık edip etmediğinin belirlenmesi için ise bazı kontrol ve diyabetik damarlar K<sup>+</sup> kanal blokleri olan TEA ( $10^{-4}$  M) ile 30 dak inkübe edilmiş ve fenilefrin ile ön kasılma elde edilmiş damarlarda ivabradin ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) ile konsantrasyon-yanıt eğrisi çıkarılmıştır (Şekil 3.5C). İvabradin ile elde edilen gevşemelerin konsantrasyon-yanıt eğrileri arasındaki farklılıklar da belirtilmiştir. L-NAME inkübasyonu yapılan kontrol ve diyabetik damarlarda ivabradinin gevşetici etkisinin ortadan kalktığı gözlenmiştir. PROP ile inkübe edilen kontrol ve diyabetik

damarlarda ise ivabradin ile elde edilen gevşeme yanıtlarının değişmediği tespit edilmiştir. TEA ile inkübe edilen kontrol damarlarda ivabradinin bazı ara konsantrasyonlarında gevşeme yanıtları TEA ile inkübe edilmeyen damarlara kıyasla azalmıştır. TEA ile inkübe edilen diyabetik damarlarda da ivabradin gevşemeleri azalma eğilimi göstermiş ancak fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuçlar ivabradinin gevşetici etkisine NO'nun, kısmen de (yalnızca sağlıklı kontrol damarlarda)  $K^+$  kanalının aracılık ettiğini ortaya koymaktadır.  $\beta$ -AR'lerin ise ivabradin gevşeme yanıtlarına katkısı bulunmamaktadır.

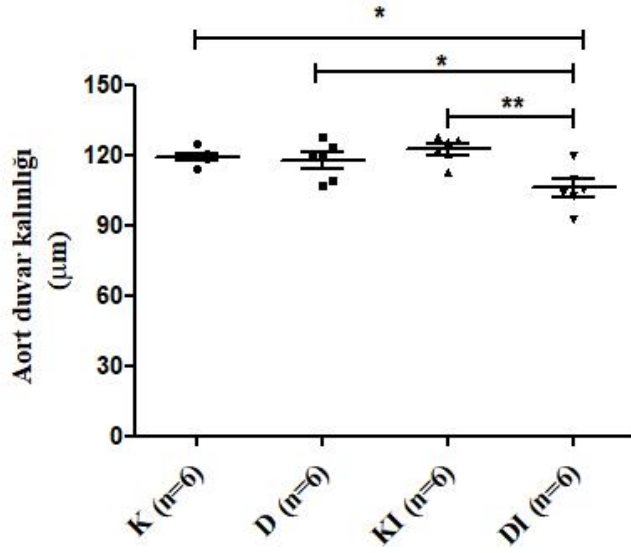
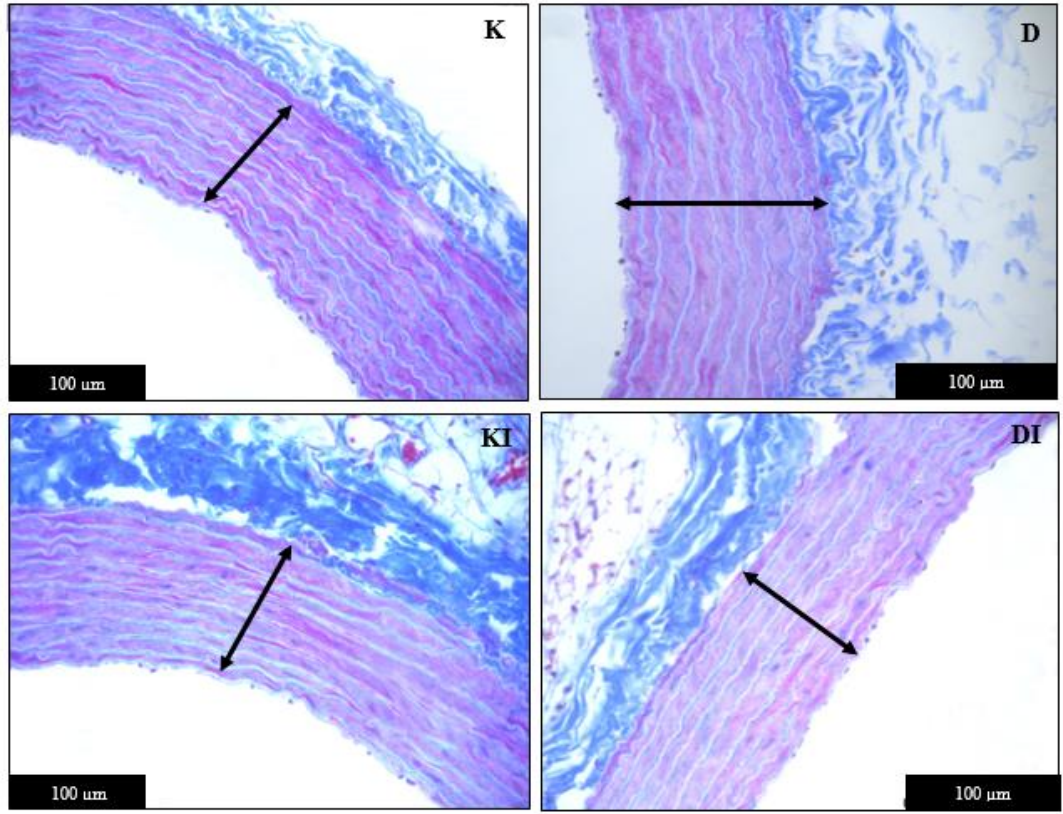


**Şekil 3.5.** Torasik Aortada İvabradin ile Elde Edilen Gevşeme Yanıtlarının Mekanizması  
Kontrol ve diyabetik damarlarda L-NAME (A), PROP (B) ve TEA (C) inkübasyonundan sonra elde edilen ivabradin ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) gevşeme yanıtları. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında parantez içinde belirtilmiştir.

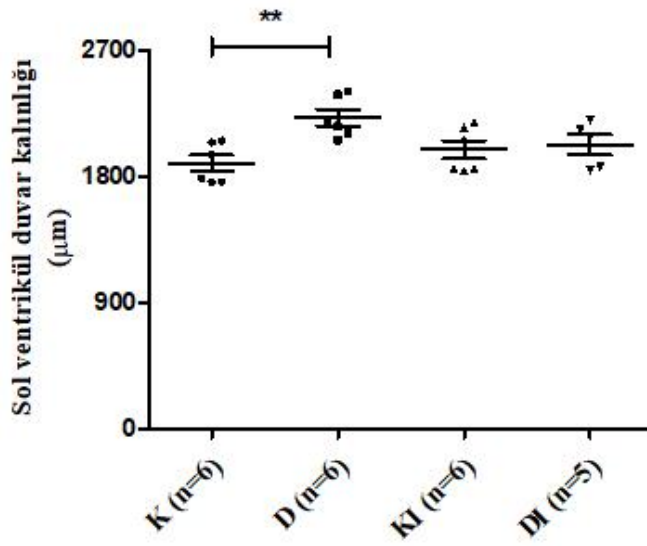
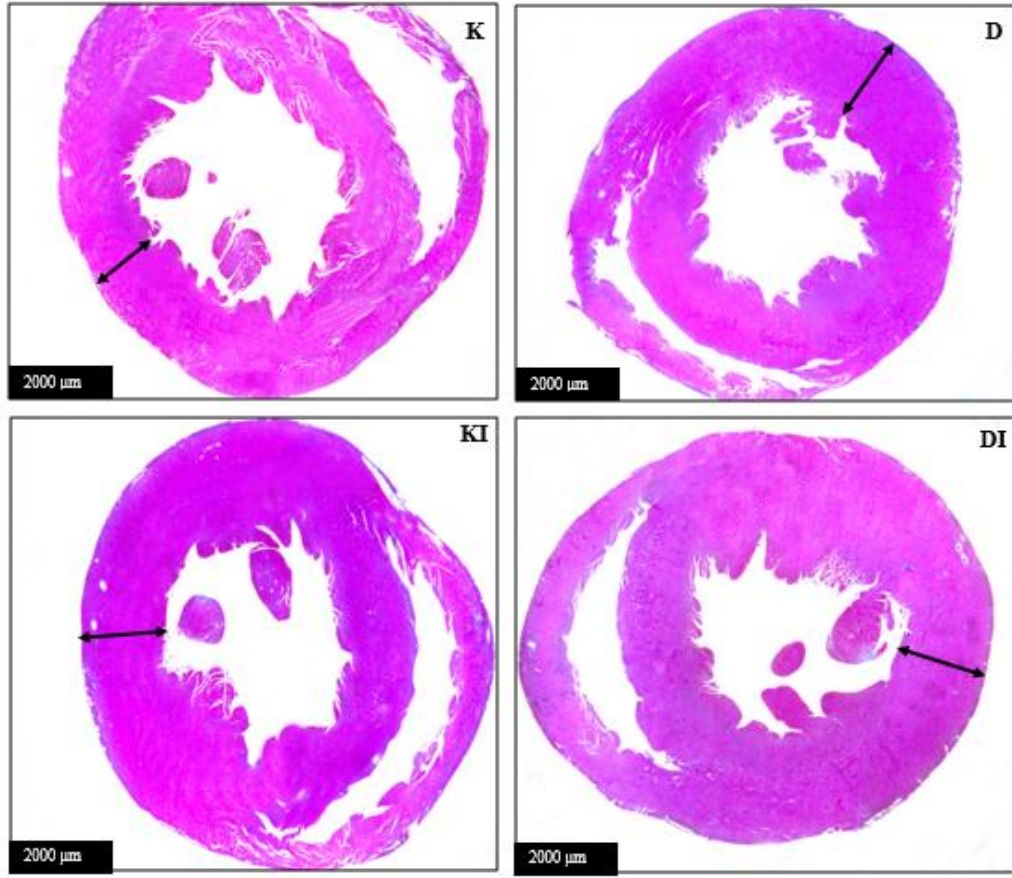
### **3.6. Histolojik İncelemelerin Sonuçları**

#### **3.6.1. Crossman'ın Üçlü Boyaması ile Elde Edilen Sonuçlar**

Dört deney grubuna ait aort ve sol ventrikül dokularından elde edilen kesitlerde Crossman'ın üçlü boyama yöntemi uygulanarak sol ventrikül ve aort duvar kalınlıkları ölçülmüştür. Kontrol ve diyabetik sıçanların aort duvar kalınlıkları arasında farklılık bulunmamıştır. İvabradin tedavili diyabetik sıçanların aort duvar kalınlığının kontrol ve diyabet gruplara kıyasla daha az olduğu bulunmuştur. Kontrol sıçanlarda ise ivabradin tedavisi aort duvar kalınlığını değiştirmemiştir (Şekil 3.6). Diyabetik sıçanların sol ventrikül duvar kalınlığının kontrole kıyasla arttığı tespit edilmiştir. İvabradin tedavisi diyabetik sıçanların sol ventrikül duvar kalınlığını azaltma eğilimi göstermiştir. İvabradin tedavisi kontrol sıçanların sol ventrikül duvar kalınlığını değiştirmemiştir (Şekil 3.7).



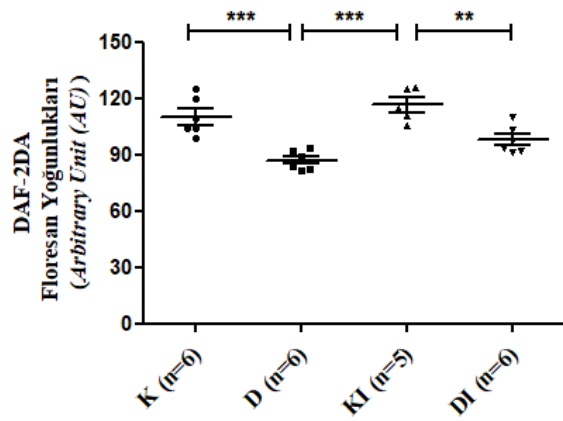
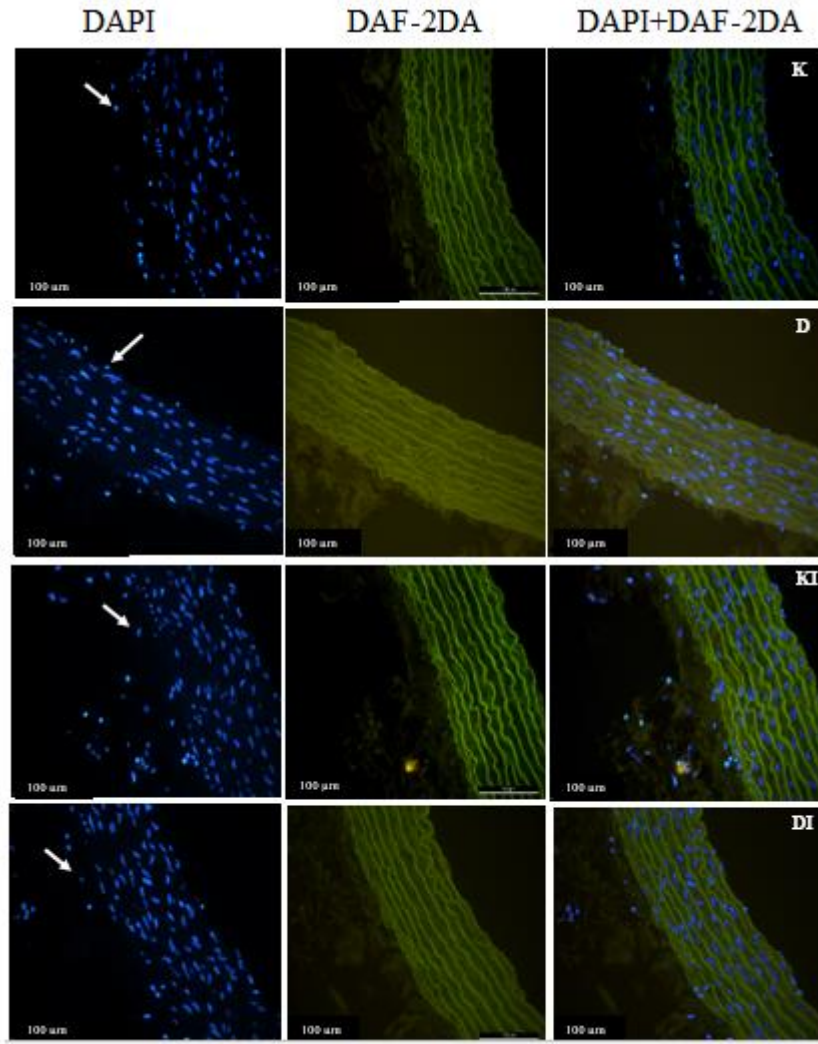
**Şekil 3.6.** Aort Kesitlerinde Crossman'ın Üçlü Boyaması  
Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında parantez içinde belirtilmiştir (40X büyütme).



**Şekil 3.7.** Sol Ventrikül Kesitlerinde Crossman'ın Üçlü Boyaması  
Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında parantez içinde belirtilmiştir (1,25X büyütme).

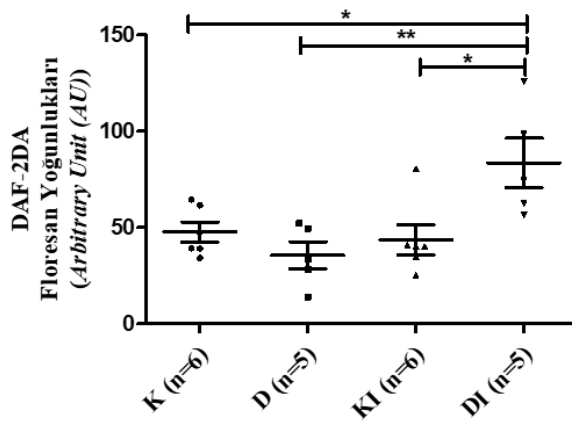
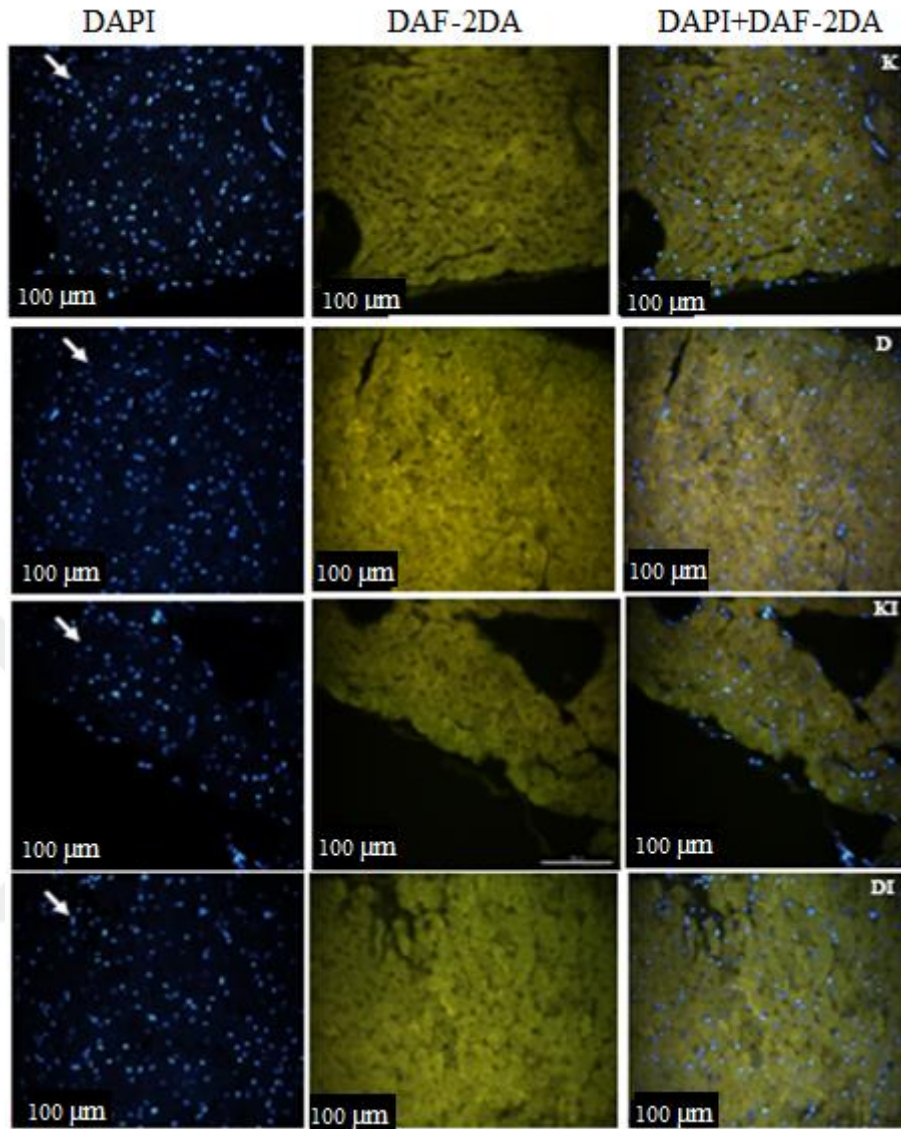
### 3.6.2. DAF-2DA Boyaması ile Elde Edilen Sonuçlar

Dört deney grubuna ait aort ve sol ventrikül dokularından elde edilen kesitlerde DAF-2DA boyaması NO yoğunlukları belirlenmiştir Aynı zamanda hücrelerin çekirdeklerini belirlemek için de DAPI boyaması yapılmıştır. Görüntüler hem ayrı ayrı hem de iki boyamanın birleştirilmiş hali ile oluşturulmuştur. Diyabetik sıçanların aortlarında NO miktarı kontrole göre belirgin bir şekilde azalmıştır. İvabradin tedavisi diyabetik sıçanların NO miktarını artırarak kontrole yaklaştırmıştır. Kontrol damarların ivabradin ile tedavi edilmesi kontrole kıyasla aorttaki NO miktarını arttırsa da bu artış anlamlı bulunmamıştır (Şekil 3.8). Diyabetik ve kontrol sıçanların sol ventriküllerindeki NO miktarı benzerdir. İvabradin tedavili diyabetik sıçanların sol ventriküllerindeki NO miktarının kontrol ve diyabete kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. (Şekil 3.9).



**Şekil 3.8.** Aort Kesitlerinde DAF-2DA Boyaması

Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında parantez içinde belirtilmiştir (40X büyütme).

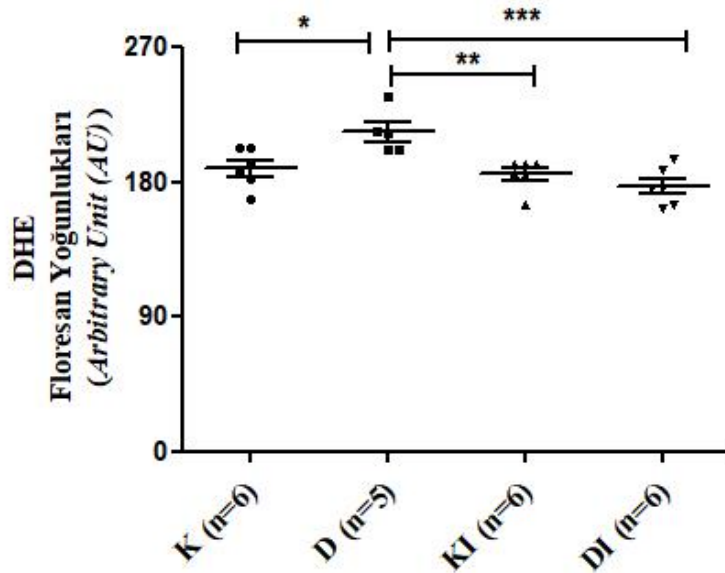
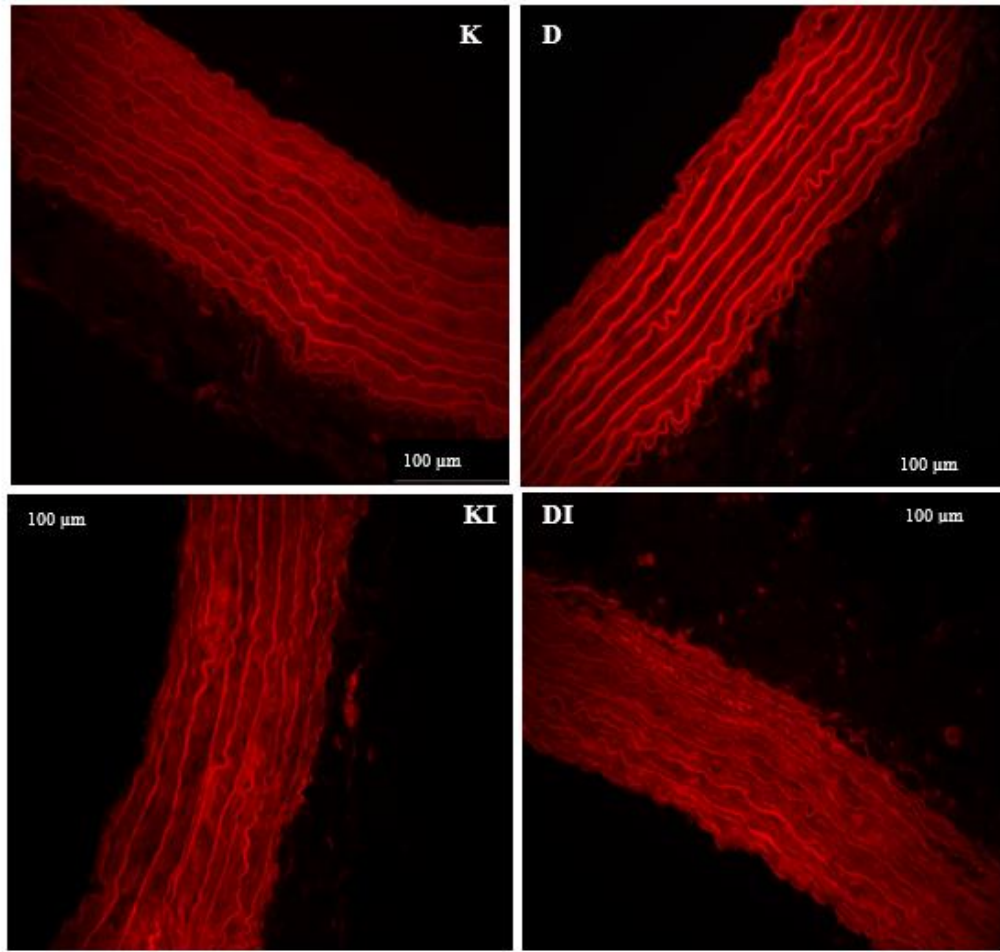


**Şekil 3.9.** Sol Ventrikül Kesitlerinde DAF-2DA Boyaması  
Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında parantez içinde belirtilmiştir (40X büyütme).

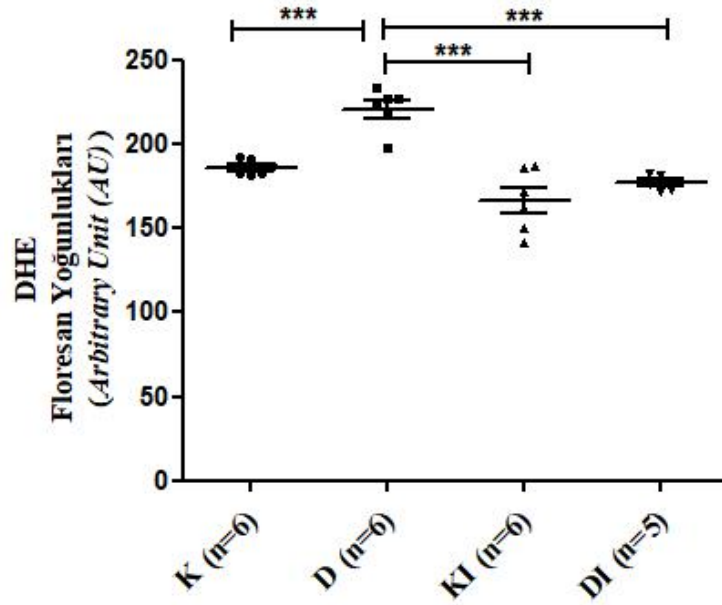
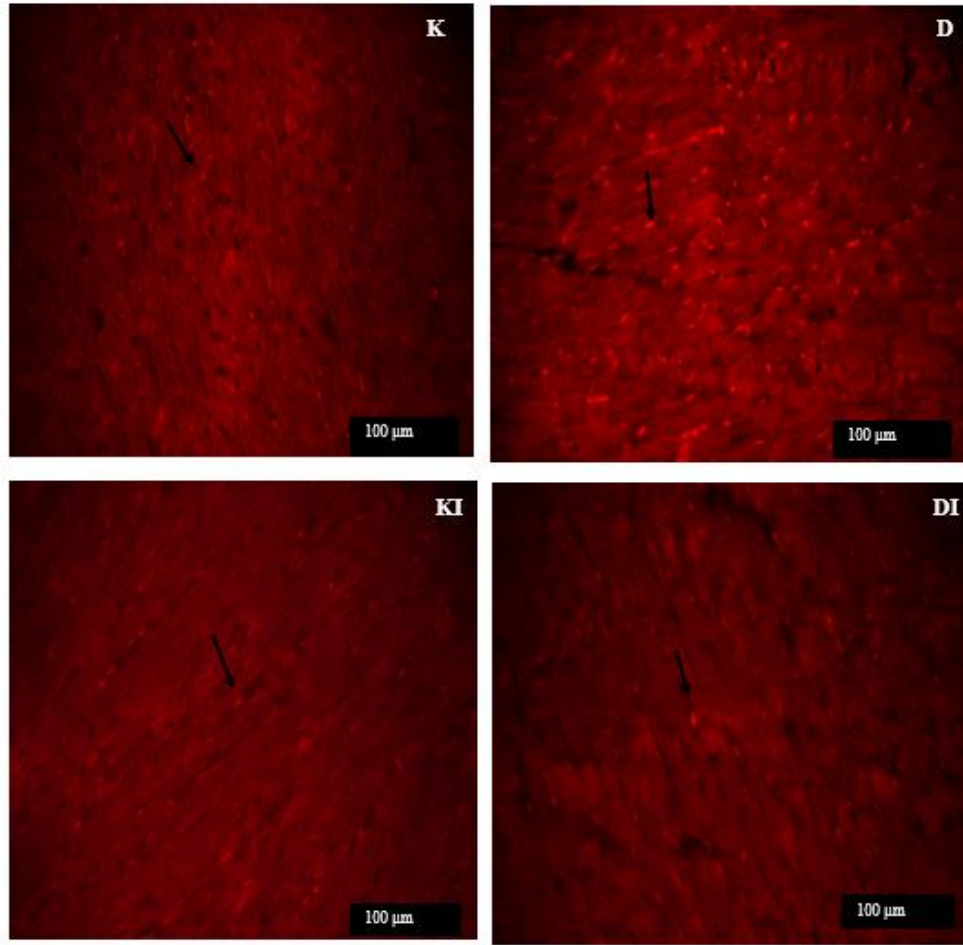
### 3.6.3. DHE Boyaması ile Elde Edilen Sonuçlar

Dört deney grubuna ait aort ve sol ventrikül dokularından elde edilen kesitlerde DHE boyaması ile süper oksit radikallerinin miktarı belirlenmiştir. Diyabetik sıçanların aortunda süper oksit radikalleri kontrollere kıyasla belirgin bir şekilde artmıştır. İvabradin tedavisi diyabetik sıçanlarda artmış olan süper oksit radikallerinin miktarını azalarak kontrol seviyeye indirmiştir (Şekil 3.10). Benzer şekilde diyabetik sıçanların sol ventriküllerindeki süper oksit radikal miktarı da kontrolden daha yüksektir ve ivabradin tedavisi ile bu durum kontrol düzeylere kadar azalmıştır (Şekil 3.11).





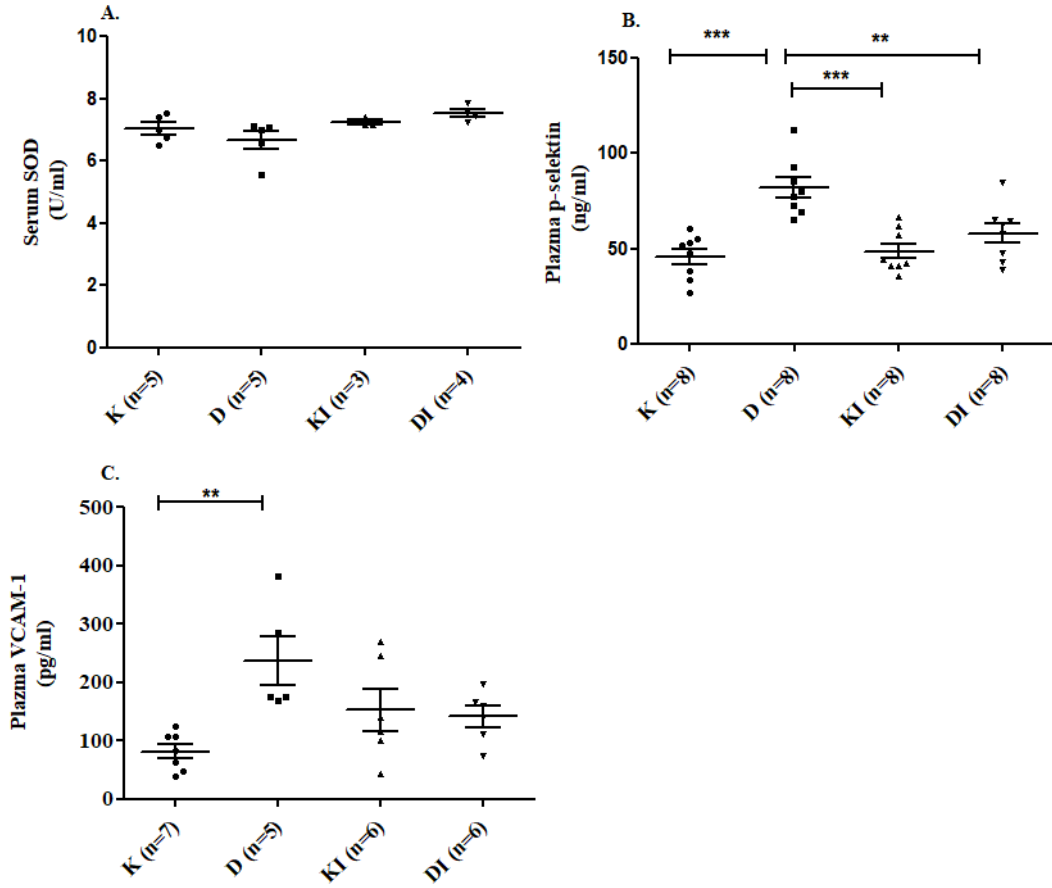
**Şekil 3.10.** Aort Kesitlerinde DHE Boyaması  
Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında parantez içinde belirtilmiştir (40X büyütme).



**Şekil 3.11.** Sol Ventrikül Kesitlerinde DHE Boyaması  
Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında parantez içinde belirtilmiştir (40X büyütme).

### 3.7. Biyokimyasal İncelemelerin Sonuçları

Sıçanların sakrifiye edilmeleri sırasında elde edilen plazma ve serumlarda STZ-diyabet ve ivabradinin SOD, p-selektin ve VCAM-1 düzeylerine etkisi değerlendirilmiştir. VCAM-1 ve p-selektin plazmada, SOD ise hem serum hem de plazmada ölçülmüştür. SOD aktivitesi gruplar arasında benzer bulunmuştur. Serum ve plazmada ölçülen SOD aktivitesi benzer çıktığı için sadece serumdaki SOD aktivitesinin sonuçları gösterilmiştir (Şekil 3.12A). p-selektin düzeyi diyabette kontrole kıyasla artmış, ivabradin tedavisi ile kontrol düzeye inmiştir (Şekil 3.12B). Benzer şekilde diyabette VCAM-1 seviyesi kontrole kıyasla yüksek bulunmuştur. İvabradin tedavisi bu artışı azaltma eğilimi göstermiştir (Şekil 3.12C).

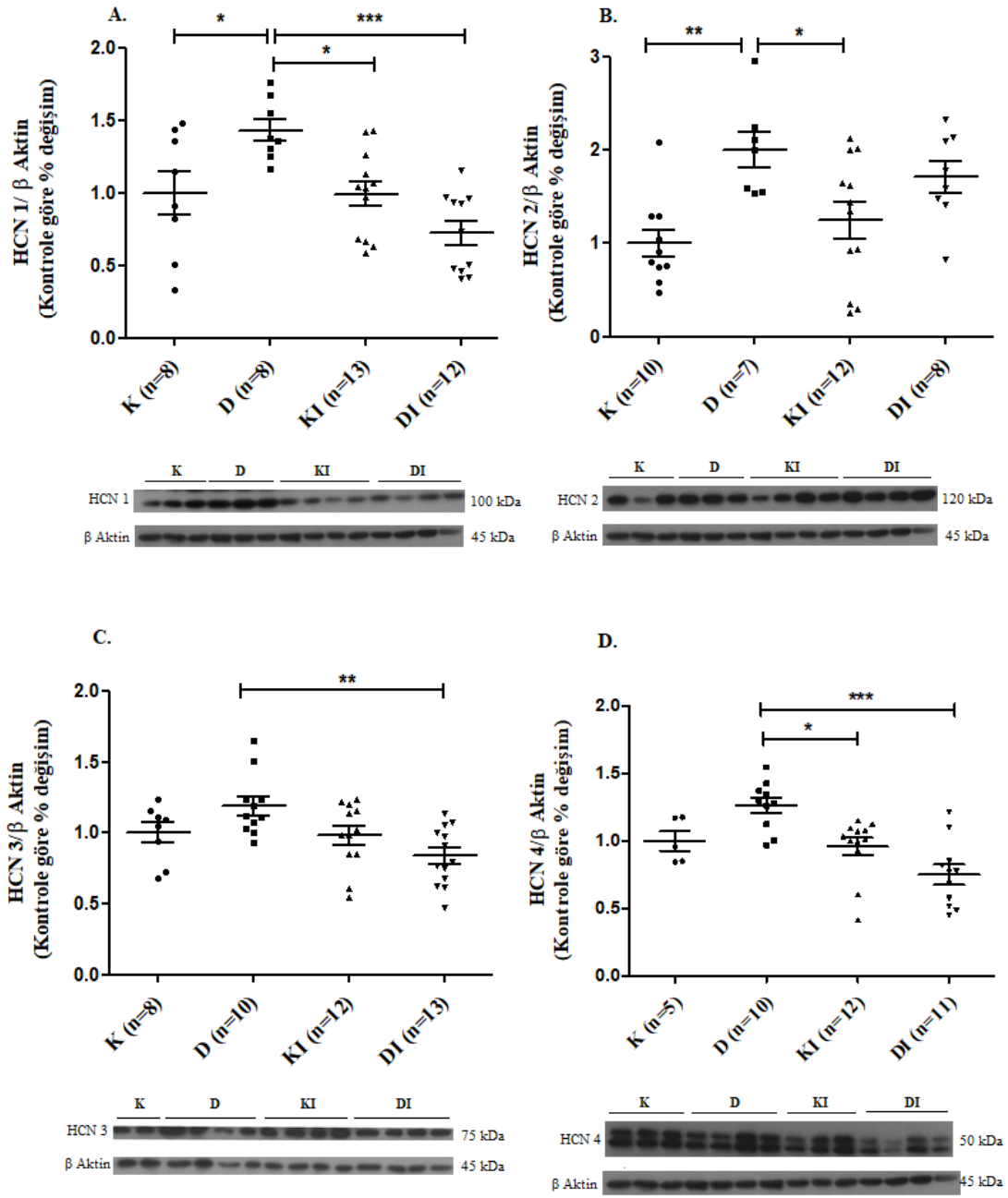


**Şekil 3.12.** SOD, p-selektin ve VCAM-1 Ölçümleri  
Serum SOD (A), Plazma p-selektin (B) ve VCAM-1 (C) ölçümleri. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında parantez içinde belirtilmiştir.

### **3.8. Sıçanlarda Gerçekleştiren Western Blot Çalışmalarının Sonuçları**

#### **3.8.1. Aort Dokusundaki Western Blot Çalışmalarının Sonuçları**

Sakrifikasyon sonrasında -80°C’de saklanan aort dokularından “Gereç ve Yöntem” başlığı altında anlatıldığı şekilde lizat hazırlanmış, BCA ölçüm kiti aracılığıyla protein miktarı ölçülerek örnekler Western blot protokolüne hazır hale getirilmiştir. Aortta HCN izoformlarının varlığı araştırılmış, eNOS ve Akt proteinleri ölçülmüştür. Aynı zamanda diyabet ve/veya kronik ivabradin tedavisinin bu proteinler üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda HCN izoformlarının aortta bulundukları tespit edilmiştir. Diyabetik damarlarda HCN1 ve HCN2 izoformlarının miktarı kontrole kıyasla artmıştır. HCN3 ve HCN4 izoformlarında diyabette gözlenen artış eğilimi ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Diyabette artmış olan HCN1 izoformu ivabradin tedavisi ile azalarak kontrol seviyeye inmiştir. Benzer şekilde ivabradin tedavili diyabetik damarların HCN3 ve HCN4 izoformlarının miktarı diyabetik damarlara kıyasla azalmıştır. Diyabette artmış olan HCN2 izoformu ise ivabradin tedavisi ile azalsa da bu azalma anlamlı bulunmamıştır. Şekil 3.13.’te aort dokusundaki HCN izoformlarının Western blot sonuçları gösterilmektedir.

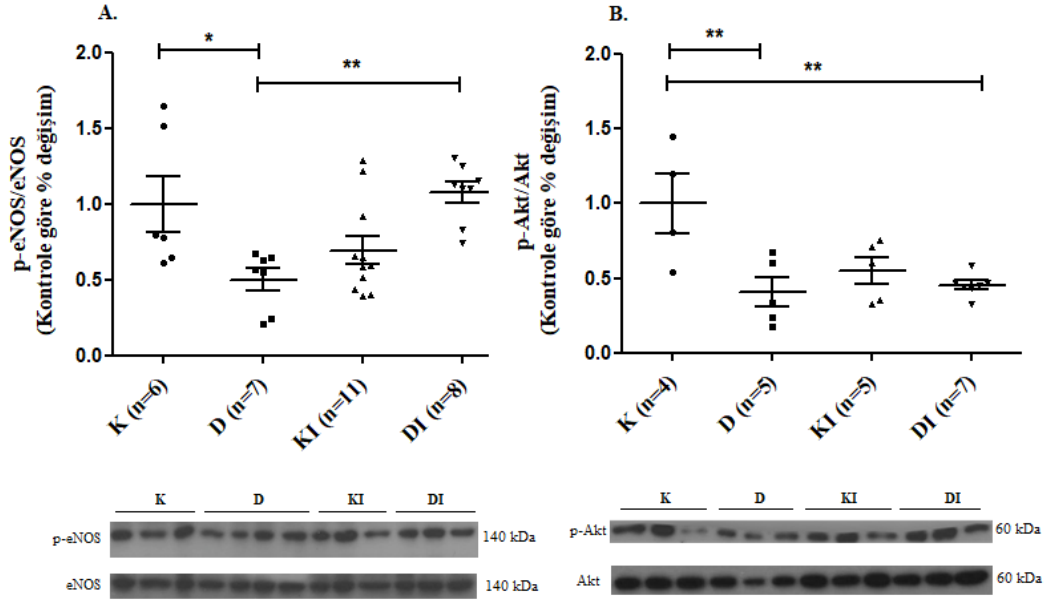


**Şekil 3.13.** Aort Dokusunda HCN İzoformlarının Miktarı

Aorttaki HCN ekspresyonları ve temsili Western blot görüntüleri. Veriler β Aktin proteini ile normalize edilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında belirtilmiştir.

Beklendiği gibi diyabetik damarlarda eNOS ve Akt proteinlerinin fosforilasyonları kontrole kıyasla belirgin olarak azalmıştır. Bu veri, eNOS ve Akt aktivitelerinin diyabette azaldığına işaret etmektedir. İvabradin tedavisi diyabetik damarlarda azalmış olan eNOS fosforilasyonu artırarak kontrol grubuna

yaklaştırmıştır. İvabradin tedavisi kontrol ve diyabetik sıçanlarda Akt proteininin fosforilasyonuna etki etmemiştir (Şekil 3.14).



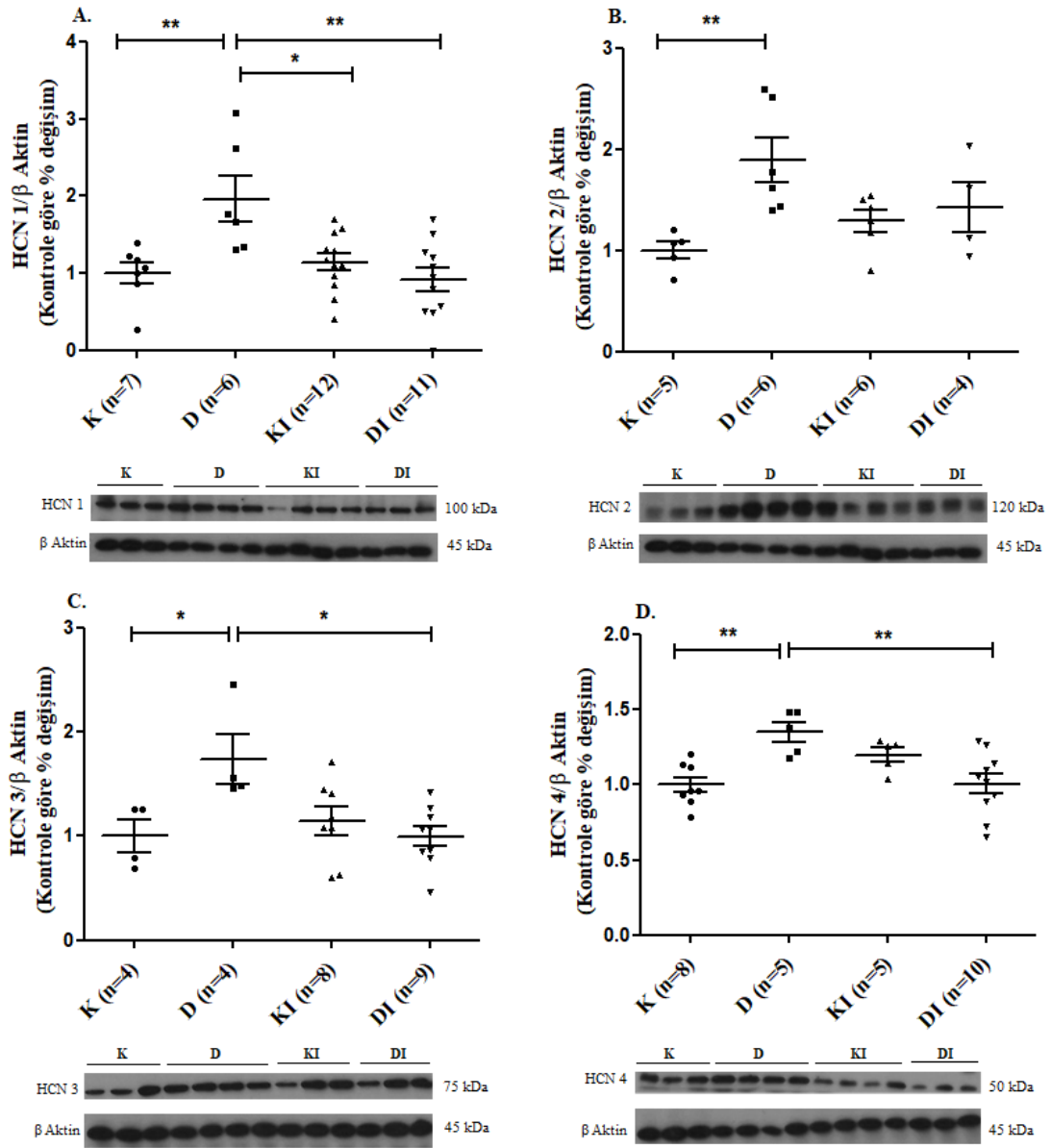
**Şekil 3.14.** Aort Dokusunda eNOS ve Akt Fosforilasyonları

Aorttaki p-eNOS ve p-Akt ekspresyonları ve temsili Western blot görüntüleri. Veriler sırasıyla total eNOS ve Akt proteinleri ile normalize edilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında belirtilmiştir.

### 3.8.2. Kalp Dokusundaki Western Blot Çalışmalarının Sonuçları

Sakrifikasyondan sonra -80°C’de saklanan kalp dokuları (sol ventrikül ve atrium) Western blot protokolüne hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan lizatlarda HCN izoformlarının varlığı ve bunların STZ-diyabet ve/veya ivabradinden nasıl etkilendikleri araştırılmıştır. Ayrıca atrium dokusunda ANP proteinin ekspresyonu ölçülmüştür.

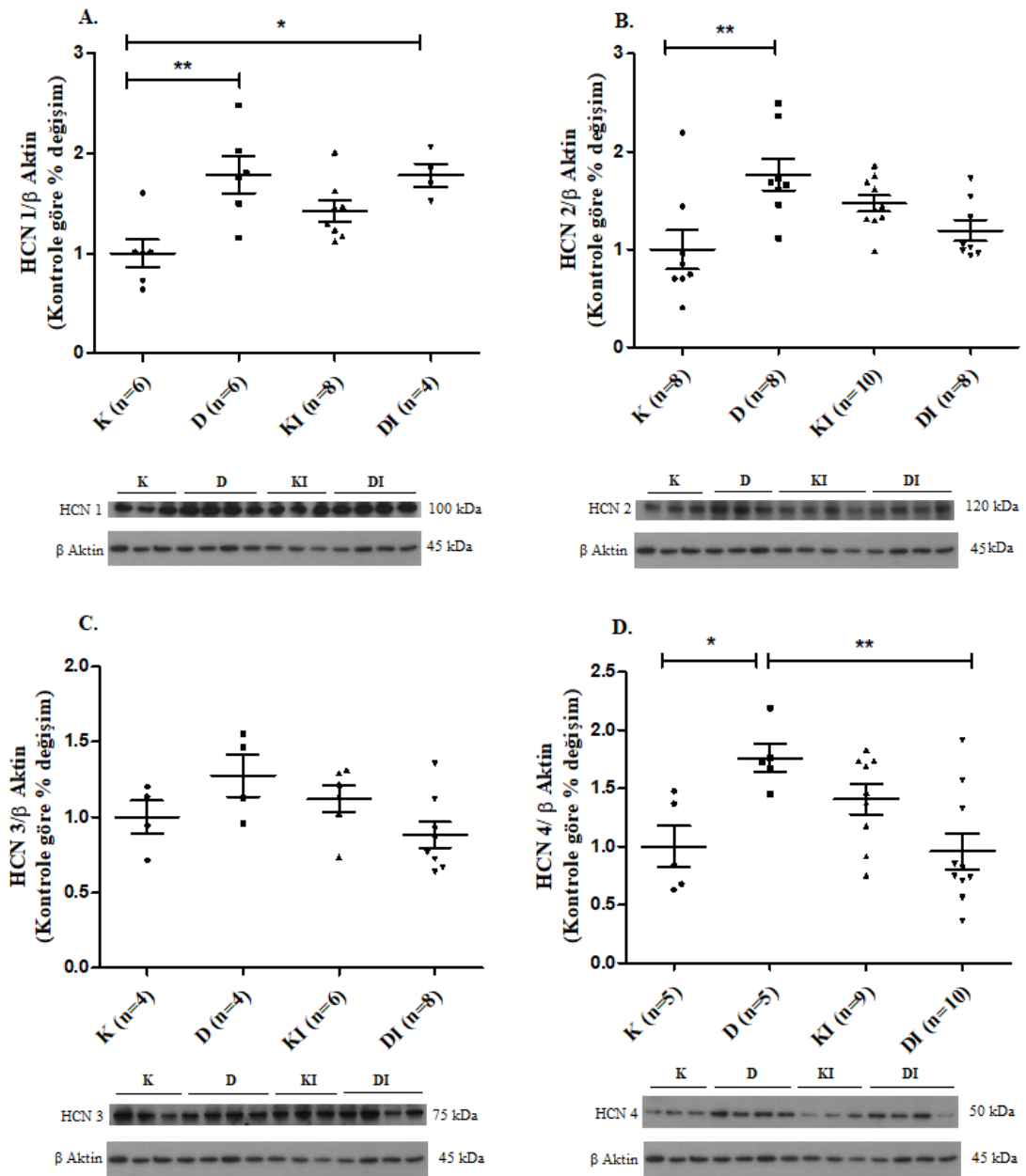
Diyabetik sıçanların sol ventrikülde dokusundaki tüm HCN izoformlarının miktarı kontrole kıyasla artmıştır. İvabradin tedavisi diyabetik sıçanlarda artmış olan HCN1, HCN3 ve HCN4 ekspresyonunu azaltarak kontrole yaklaştırmıştır. İvabradin tedavili diyabetik sıçanlarda HCN2 izoformunun miktarı azalsa da bu azalış anlamlı bulunmamıştır (Şekil 3.15).



**Şekil 3.15.** Sol Ventrikül Dokusunda HCN İzofomlarının Miktarları

Sol ventriküldeki HCN ekspresyonları ve temsili Western blot görüntüleri. Veriler β Aktin proteini ile normalize edilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında belirtilmiştir.

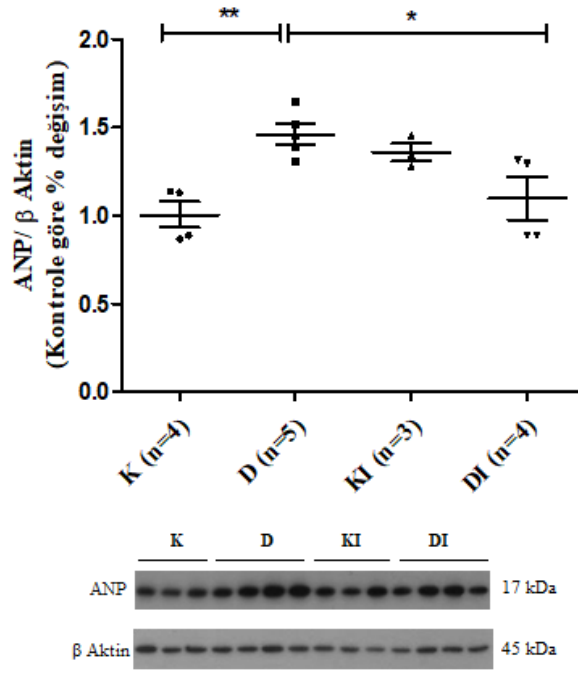
Atrium dokusunda yapılan Western blot incelemeleri sonucunda diyabetik sıçanlarda HCN1-4 izofomlarının ekspresyonunları kontrole göre artış eğilimi göstermiş, ancak HCN3 izofomundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. İvabradin tedavili diyabetik sıçanlarda HCN2 ve HCN4 izofomlarının azaldığı ve kontrol değere yaklaştığı tespit edilmiştir (Şekil 3.16).



**Şekil 3.16.** Atrium Dokusunda HCN İzoformlarının Miktarları

Atriumdaki HCN ekspresyonları ve temsili Western blot görüntüleri. Veriler β Aktin proteini ile normalize edilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında belirtilmiştir.

Atrium dokusunda ANP proteinin ekspresyonu diyabetik sıçanlarda kontrole kıyasla anlamlı olarak artmıştır. Diyabette artmış olan ANP ekspresyonunun ivabradin tedavisi ile azaldığı tespit edilmiştir. Şekil 3.17.'de atrium dokusunda ANP proteinin Western blot sonucu gösterilmektedir.

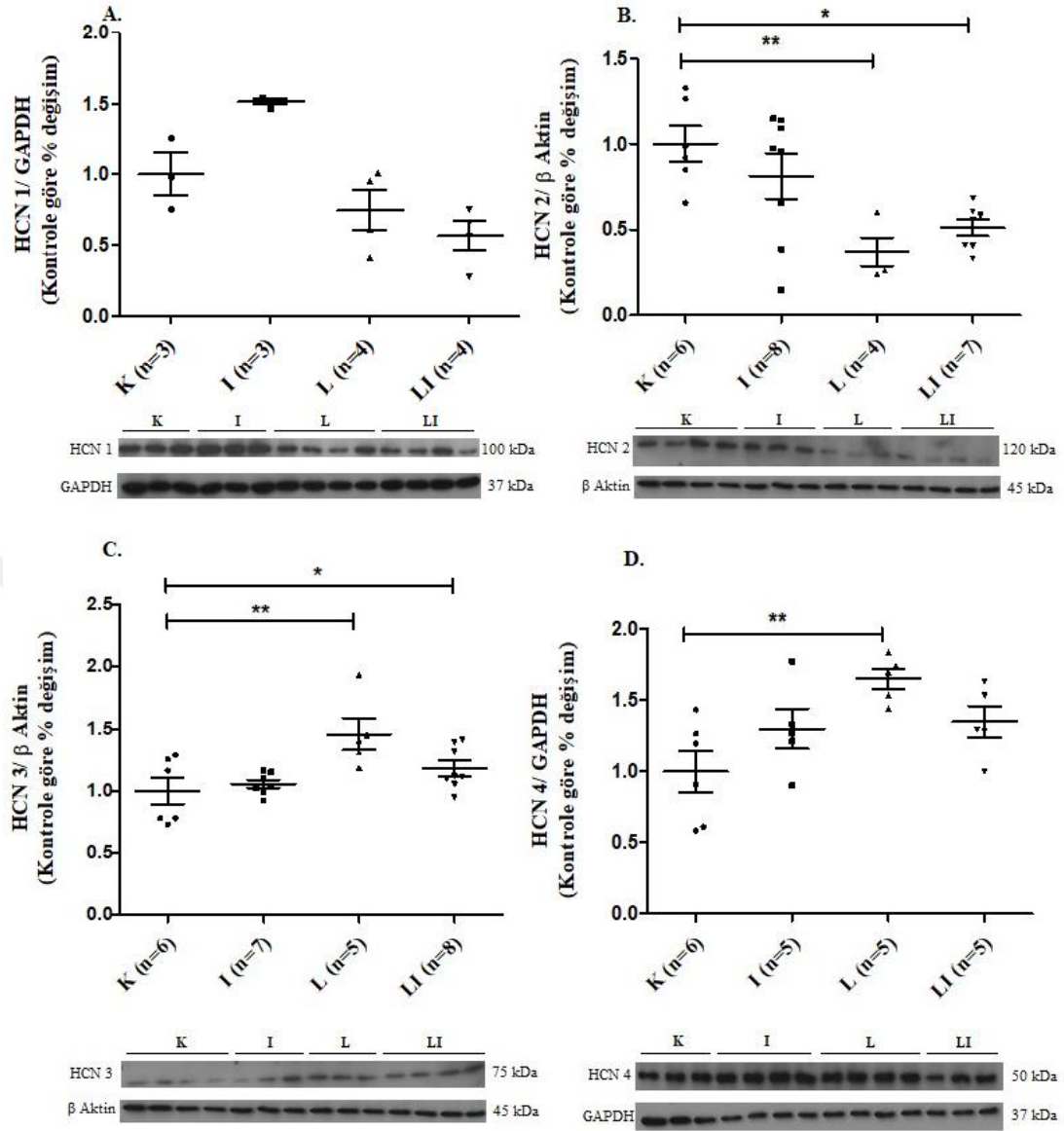


**Şekil 3.17.** Atrium Dokusunda ANP Miktarı

Atriumdaki ANP ekspresyonu ve temsili Western blot görüntüsü. Veriler  $\beta$  Aktin proteini ile normalize edilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında belirtilmiştir.

### 3.9. HUVEC’lerde Gerçekleştirilen Çalışmaların Sonuçları

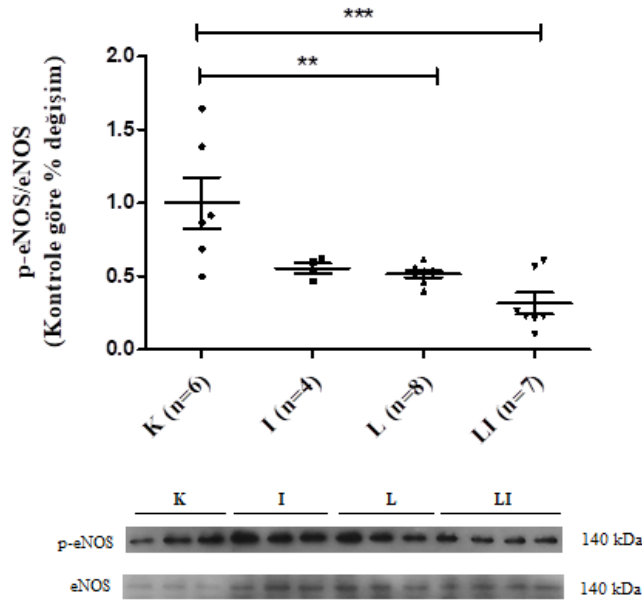
HUVEC’lerden hazırlanan lizatlar Western blot protokolüne hazır hale getirildikten sonra bu hücrelerde HCN izoformlarının varlığı araştırılmış ve eNOS proteinin tayini yapılmıştır. HUVEC’lerde tüm HCN izoformlarının bulunduğu tespit edilmiştir. Çalışma bir aşama daha ileri götürülerek bu izoformların ivabradin ve L-NAME uygulamasından nasıl etkilendiği değerlendirilmiştir. İvabradinin tek başına uygulanması HCN izoformlarının miktarını değiştirmemiştir. Tek başına L-NAME uygulaması yapılan hücrelerde kontrole kıyasla HCN1 değişmemiş, HCN2 azalmış, HCN3 ve HCN4 izoformlarının miktarları ise artmıştır. L-NAME inkübasyonu ile azalan HCN2 miktarı ve artan HCN3 miktarı ivabradin varlığından etkilenmemiştir. Son olarak L-NAME inkübasyonu ile artan HCN4 miktarı ivabradin uygulamasından sonra azalarak kontrol değere yaklaşmıştır (Şekil 3.18).



**Şekil 3.18.** HUVEC'lerde HCN İzofomlarının Miktarları

HUVEC hücrelerde HCN ekspresyonları ve temsili Western blot görüntüleri. Veriler GAPDH ve β Aktin proteinleri ile normalize edilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında belirtilmiştir.

HUVEC'lerin bazal koşullardaki ve ivabradin uygulamasından sonraki eNOS ve p-eNOS proteinlerinin ekspresyonları bu çalışma kapsamında incelenmiştir (Şekil 3.19). Aynı zamanda bu proteinlerin ekspresyonlarının L-NAME ve ivabradin uygulamasından nasıl etkilendiği de araştırılmıştır. Tek başına ivabradin uygulaması eNOS fosforilasyonu kontrole göre değiştirmezken, L-NAME uygulaması yapılan grupta bu proteinin fosforilasyonu kontrole göre belirgin olarak azalmıştır. L-NAME grubunda azalmış olan eNOS fosforilasyonu ivabradin tedavisi ile düzelmemiştir.

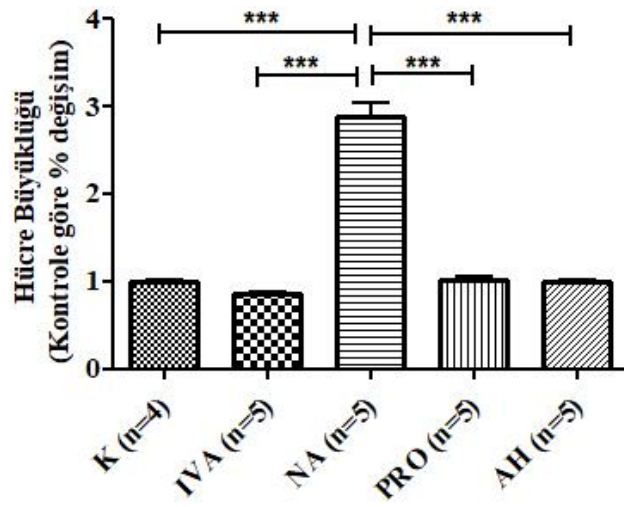
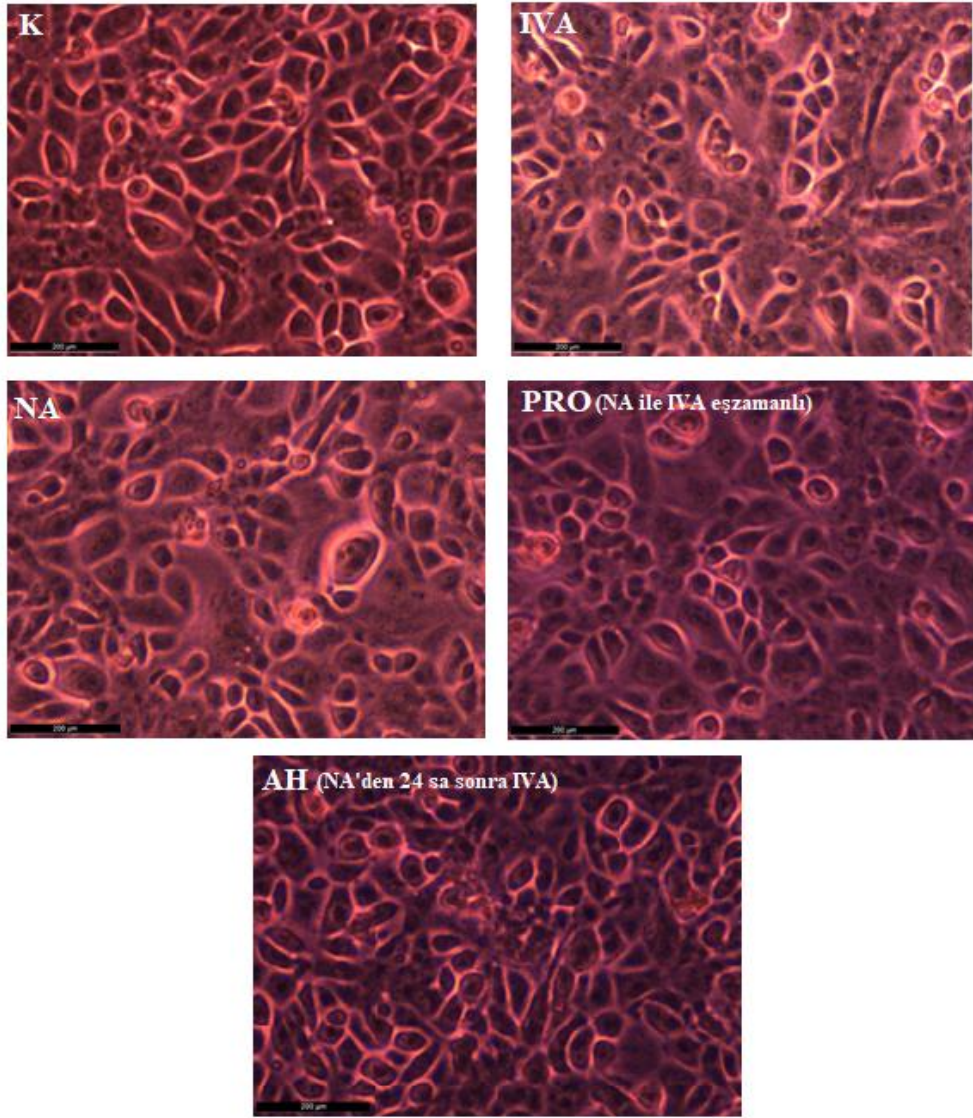


**Şekil 3.19.** HUVEC'lerin p-eNOS ve eNOS Protein Miktarları

HUVEC'lerde p-eNOS, eNOS ekspresyonları ve temsili Western blot görüntüleri. Veriler total eNOS proteini ile normalize edilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında belirtilmiştir.

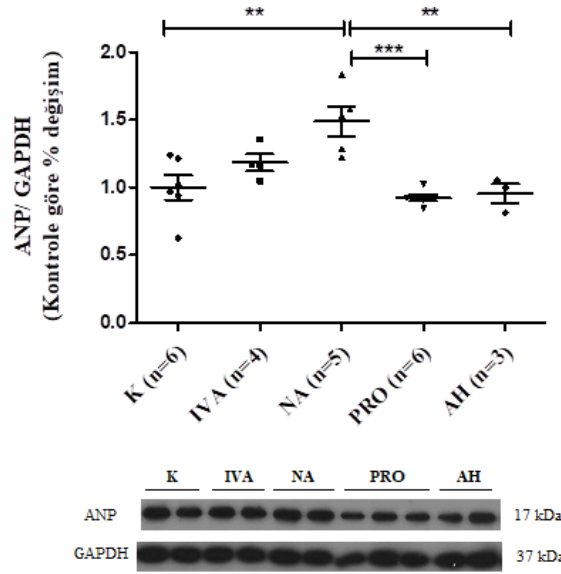
### 3.10. H9c2 Hücrelerde Gerçekleştirilen Çalışmaların Sonuçları

H9c2 hücrelerde noradrenalin ile hipertrofi modeli oluşturulduktan sonra ivabradinin olası antihipertrofik ve/veya protektif etkileri araştırılmıştır. Morfolojik incelemeler noradrenalin inkübasyonundan 24 ve 48 sa sonra mikroskopta görüntülerinin alınmasının ardından yapılmıştır. Şekil 3.20.'de noradrenalin uygulamasından 48 sa sonra elde edilen temsili görüntüler (40X büyütme) ve morfolojik analizlerin sonuçları gösterilmiştir. H9c2 hücrelerde noradrenalin uygulamasıyla hücre büyüklüğü kontrole kıyasla belirgin bir şekilde artmış ve hipertrofi modelinin oluşumu doğrulanmıştır. İvabradinin protektif ve antihipertrofik etkisini değerlendirmek için farklı zamanlarda (sırasıyla noradrenalinle eşzamanlı olarak ve noradrenalininden 24 sa sonra) ivabradin uygulaması yapılan gruplarda hücre büyüklüğünün kontrol grubu ile benzer olduğu tespit edilmiştir. Yani ivabradin noradrenalin grubunda artmış olan hücre büyüklüğünü azaltmıştır. İvabradinin tek başına uygulaması kontrol hücrelerin büyüklüğünü değiştirmemiştir.



**Şekil 3.20.** H9c2 Hücrelerde Hipertrofi Modelinin Oluşturulması ve İvabradinin Etkileri  
Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında parantez içinde belirtilmiştir (40X büyütme).

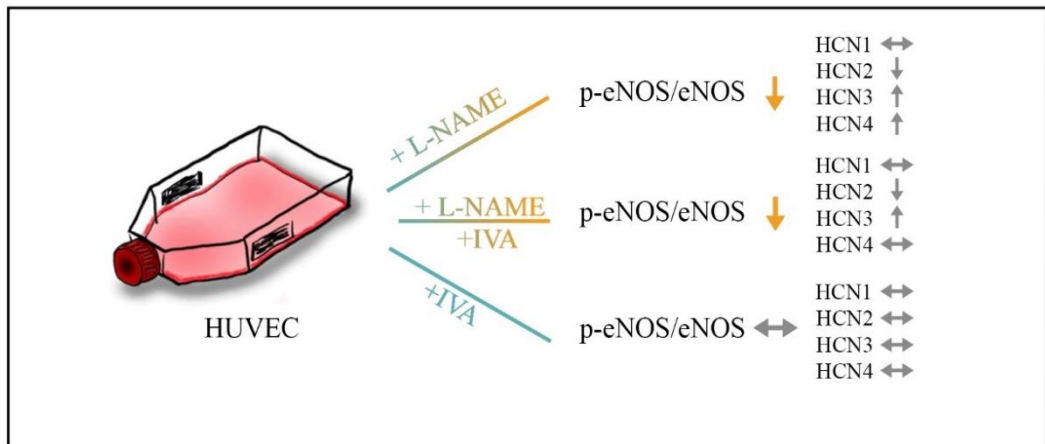
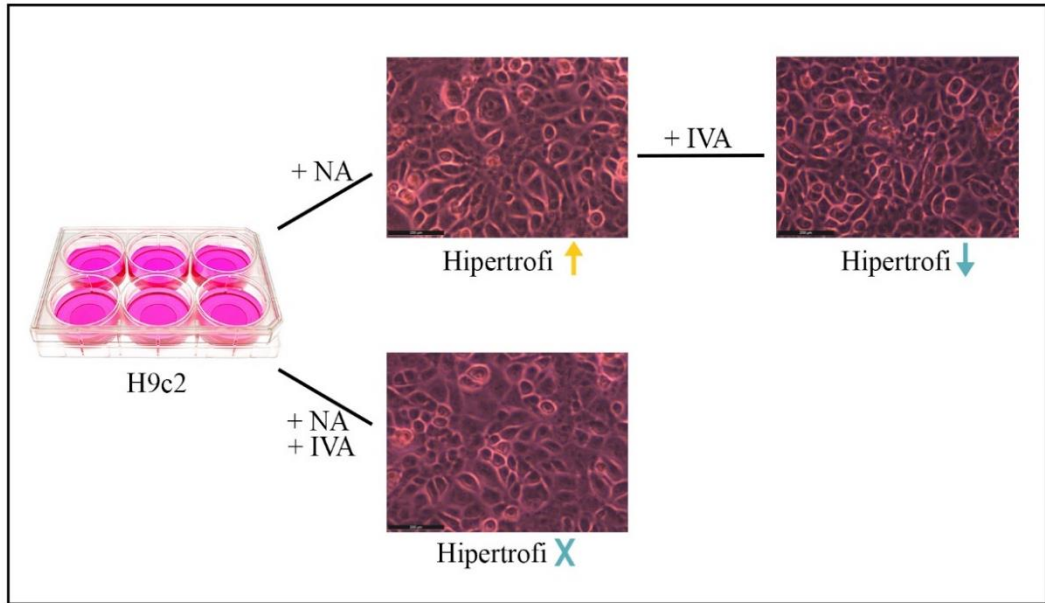
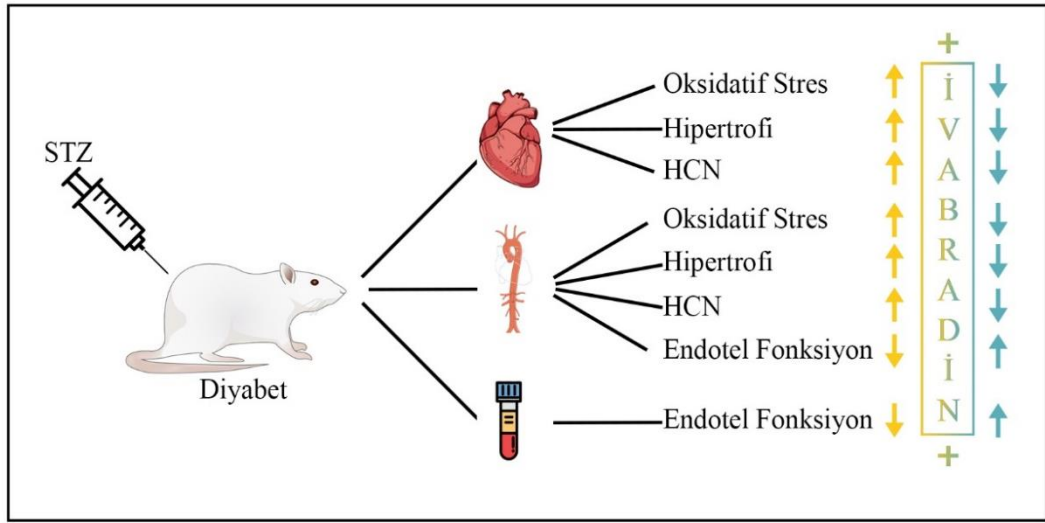
H9c2 hücrelerden elde edilen lizatlar Western blot protokolüne hazır hale getirildikten sonra ANP proteinin miktar tayini yapılmıştır. Morfolojik incelemelerin sonuçlarına benzer şekilde ivabradinin tek başına uygulanması ANP miktarını değiştirmemiştir. Noradrenalin uygulaması ANP ekspresyonunu belirgin bir şekilde artırmıştır. İvabradinin protektif ve antihipertrofik etkilerinin değerlendirildiği gruplarda noradrenalin grubunda artmış olan ANP miktarının ivabradin uygulaması ile azaldığı bulunmuştur (Şekil 3.21).



**Şekil 3.21.** H9c2 Hücrelerde ANP Protein Miktarı

H9c2 hücrelerde ANP ekspresyonu ve temsili Western blot görüntüsü. Veriler GAPDH ile normalize edilmiştir. Her gruptaki örnek sayısı grup adının yanında belirtilmiştir.

Özet olarak; bu tez çalışması kapsamında yapılan hayvan ve hücre kültürü çalışmalarının sonuçları Şekil 3.22.'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.22. Hayvan ve Hücre Kültürü Çalışmalarının Sonuçlarının Şematik Gösterimi

#### 4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında ivabradinin sağlıklı ve diyabetik damarlardaki doğrudan etkisi değerlendirildikten sonra damar tonusunun düzenlenmesine aracılık eden yolaklardaki etkisi araştırılmıştır. Endotel hasarı oluşturulmuş diyabetik modelde kronik ivabradin tedavisinin endotel hasarını önleyici ya da tedavi edici etkinliği değerlendirilmiştir. STZ-diyabet ve ivabradinin oksidatif stres, NO ve endotel hasar üzerine etkileri histolojik ve biyokimyasal incelemelerle araştırılmıştır. Aynı zamanda ivabradinin olası antihipertrofik etkisi hem diyabetik sıçan kalbinde hem de hipertrofi modeli oluşturulmuş H9c2 hücrelerde incelenmiştir. HCN izoformlarının lokalizasyon ve ekspresyonlarının STZ-diyabetten ve ivabradinden nasıl etkilendikleri sıçan aortasında ve kalbinde araştırılmıştır. Benzer şekilde HUVEC’lerde de bu izoformların varlığı, ivabradin ve/veya L-NAME uygulamasının bu izoformlar üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

STZ-diyabet ve kronik ivabradin tedavisinin hemodinamik parametreler üzerindeki etkileri incelendiğinde STZ-diyabetik sıçanların kalp atım hızı ve kan basıncını değerlerinin tedavinin 1. haftasında değişmediği, diyabetik sıçanlarda yalnızca kalp atım hızının tedavinin 3. haftasında azaldığı tespit edilmiştir. Tedavinin 1. ve 3. haftalarında kontrol sıçanların kalp atım hızı ve kan basıncı ivabradin tedavisi ile değiştirmemiştir. İvabradin diyabetik sıçanların kalp atım hızını ise tedavinin 1.ve 3. haftalarında azaltmıştır. İvabradinin kalp atım hızını azaltıcı etkisinin yalnızca diyabetik sıçanlarda gözlenmesi, bu durumun HCN izoformlarının ekspresyonunun diyabetik sıçanlarda artması ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

İvabradin kalbin kontraktilitesini etkilemeksizin kalp atım hızını azaltan bir ilaçtır. İlginç şekilde tedavinin 3. haftasında ivabradin tedavili diyabetik sıçanların kan basıncı değerleri hem kontrol hem de diyabetik gruplara kıyasla daha düşük bulunmuştur. Histolojik inceleme sonuçlarına bakıldığında da ivabradin tedavisi diyabetik sıçanların aort duvar kalınlığı hem kontrol hem de diyabetik gruplara

kıyasla belirgin bir şekilde azaltmıştır. Arthur-Ataam ve ark. (2019) tarafından hipertansif sıçanlarda aort duvar kalınlığının daha fazla olduğu gösterilmiştir (Arthur-Ataam ve ark., 2019). İvabradin tedavisi ile diyabetik sıçanların kan basıncının azalması ivabradinin kardiyovasküler pleiotropik etkileri (aort duvar kalınlığını azaltıcı etki) nedeniyle gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmüştür.

Bu tez çalışmasında ivabradinin kan basıncını düşürücü etkisine benzer şekilde Simko ve ark. (2018), L-NAME ile oluşturulmuş hipertansif Wistar erkek sıçanlarda dört haftalık kronik ivabradin tedavisinin ortalama sistolik kan basıncını düşürdüğünü ve kontrol sıçanlarda ise değiştirmedığını bulmuşlardır. Ayrıca ivabradinin kontrol ve hipertansif sıçanlarda kalp atım hızını azalttığı gösterilmiştir (Simko ve ark., 2018).

Bu tez çalışmasında KCl kasılmasının gruplar arasında benzer olduğu bulunmuştur. Diyabetik sıçanlarda fenilefrin kasılmaları kontrole kıyasla artma eğilimi göstermiştir. STZ-diyabetik sıçanlarda damar fonksiyonlarındaki bozulmaya bağlı olarak fenilefrin kasılmalarının artması beklenmektedir. Diyabetik sıçanlarda fenilefrin kasılmasının kontrol grubu ile benzer bulunması diyabetik grupta damar fonksiyonlarının bozulmadığını söylemek için tek başına yeterli değildir. Bu tez çalışmasında STZ-diyabetik sıçanların damar fonksiyonları değerlendirmek için çok sayıda deneysel çalışma gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalarda endotel disfonksiyonunun gelişimi doğrulanmıştır. Bu çalışmada ivabradin tedavili diyabetik damarlarda fenilefrinin yüksek konsantrasyonlarında fenilefrin kasılmalarının kontrole göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu sonuç diyabetik sıçan aortasında artmış olan HCN2 izoformunun ivabradin tedavisi ile azalmamasına bağlı olarak HCN2 izoformunun kasılma yanıtlarına aracılık edebileceğini düşündürmüştür.

İzole organ banyosu çalışmalarında diyabetik damarlarda endotel bağımlı (asetilkolin) ve endotel bağımsız (izoprenalin) gevşeme yanıtlarının kontrole kıyasla azaldığı gözlenmiştir. Azalan bu gevşeme yanıtlarının ivabradin tedavisi ile düzelme eğiliminde olduğu bulunmuştur. Düz kas aracılı (SNP) gevşemelerin ise tüm deney gruplarında benzer olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, STZ-diyabetik sıçanlarda

diyabetik vasküler disfonksiyon geliştiğini göstermektedir. Yapılan çok sayıda çalışmada bu tez çalışmasının bulgularını destekleyen nitelikte STZ-diyabetik hayvanlarda endotel disfonksiyonun geliştiği gözlenmiştir. Giriş bölümündeki “1.4.1. Diyabet ve Vasküler Fonksiyon Bozukluğu Arasındaki İlişki” başlığı altında da detaylandırıldığı gibi diyabet ve vasküler fonksiyon bozukluğu gelişimi arasında sıkı bir ilişki bulunmaktadır. Diyabette, hem koroner hem de periferik arterlerde endotel disfonksiyonunun bir göstergesi olarak vazodilatör yanıtların azaldığı bilinmektedir (Johnstone ve ark., 1993; McVeigh ve ark., 1992; Nicolls ve ark., 2007; Steinberg ve ark., 1996 ve Williams ve ark., 1996).

Tez çalışmasında STZ-diyabetik endotel disfonksiyonu gelişimini destekler şekilde diyabetik sıçanlarda kontrole kıyasla eNOS ve Akt proteinlerinin fosforilasyonlarının belirgin olarak azaldığı gözlenmiştir. Diyabetik sıçanlarda kronik ivabradin tedavisi Akt fosforilasyonunu değiştirmezken, eNOS fosforilasyonunu artırarak kontrol değere yaklaştırmıştır. Histolojik incelemelerde diyabetik damarların NO miktarının azaldığı ve ivabradin tedavisi ile NO miktarının kontrol değere yaklaştığı gösterilmiştir. Bu bulgular, ivabradinin STZ-diyabetik sıçanlarda endotel disfonksiyonu eNOS yolağı üzerinden düzeltebildiğini düşündürmüştür. Diyabetik ve kontrol sıçanların sol ventriküllerindeki NO miktarı benzerdir. İvabradin tedavili diyabetik sıçanların sol ventriküllerindeki NO miktarının kontrol ve diyabete kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. İvabradin tedavisi kalpte NO oluşumunu artırarak diyabete bağlı gelişen kardiyovasküler komplikasyonları iyileştirmektedir.

Custodis ve ark. (2008) tarafından ApoE<sup>-/-</sup> farelerin aort preparatlarında endotel bağımlı (karbakol), endotel bağımsız (gliseroltrinitrat) gevşeme ve kasılma yanıtları izole organ banyosu çalışmaları ile değerlendirmiştir. İvabradinin ApoE<sup>-/-</sup> farelerde bozulmuş olan endotel bağımlı gevşeme yanıtlarını iyileştirdiği ancak endotel bağımsız gevşeme yanıtlarını değiştirmediği bulunmuştur. Yine bu çalışmada fenilefrin ve KCl kasılma yanıtlarının gruplar arasında benzer olduğu gösterilmiştir. Özetle, bu çalışmada ivabradinin ApoE<sup>-/-</sup> farelerde kalp atım hızının azaltılmasına bağlı olarak endotel disfonksiyonunu iyileştirdiği bulunmuştur (Custodis ve ark.,

2008). Benzer şekilde anjiyotensin II ile oluşturulmuş hipertansif Wistar sıçanlarda ve ApoE<sup>-/-</sup> farelerde kronik ivabradin (10 mg/kg/gün) tedavisi ile bu modellerde bozulmuş olan asetilkolin ve nitrogliserin gevşemelerinin düzeldiği gösterilmiştir (Kroller-Schon ve ark., 2011). Başka bir deneysel çalışmada ise ivabradinin ApoE<sup>-/-</sup> farelerde aterosklerotik lezyon oluşumu ve erektil disfonksiyon üzerine etkisi araştırılmıştır. İvabradin tedavisi ile ApoE<sup>-/-</sup> farelerde aortik aterosklerotik lezyon büyüklüğünün azaldığı bulunmuştur. Korpus kavernozum dokusunda endotel bağımlı gevşeme (karbakol gevşemeleri) yanıtları ApoE<sup>-/-</sup> farelerde azalmış, ivabradin tedavisi bunu önlemiş ya da geri çevirmiştir. Aynı zamanda penis dokusunda DHE boyaması ile ivabradinin süperoksit üretimini azalttığı bulunmuştur. Son olarak, ivabradin tedavili hayvanların penis dokusunda eNOS miktarının arttığı, kollajen içeriğinin ise azaldığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar tarafından ivabradinin oksidatif stresi azaltarak penis endotel fonksiyonları düzelttiği ifade edilmiştir (Baumhakel ve ark., 2010). Yukarıda özetlenen çalışmaların sonuçları bu tez çalışmasının bulguları ile paralellik göstermektedir. STZ-diyabetik sıçanlarda bozulmuş olan gevşeme yanıtlarının ivabradin tedavisi ile iyileşme gösterdiği ortaya konmuştur.

Yirmibir koroner arter hastasında intrakoroner *Doppler* ile akış ölçülmüş ve ivabradin (günde 2 kez 5 mg) tedavisi ile koroner akış hızı ve rezervininin tedavi öncesine kıyasla düzeldiği bildirilmiştir. Buna göre, ivabradinin koroner damarlarda endotel fonksiyonu iyileştirici etkisi olabileceği yorumu yapılmış, ancak bunun mekanizması incelenmemiştir (Skalidis ve ark., 2011).

RIVENDEL (*Heart Rate Reduction by Ivabradine for Improvement of Endothelial Function in Patients with Coronary Artery Disease*) çalışmasında stabil koroner arter hastalarında ivabradin tedavisinin FMD ve NMD parametrelerini düzelttiği tespit edilmiştir (Mangiacapra ve ark., 2017).

Geçtiğimiz yıl yapılan bir çalışmada kronik stabil anjina (sinüs ritminde ve dinlenme sırasındaki kalp atım hızı >70 bpm) hastalarında ivabradin (günde 2 kez 7,5 mg) tedavisinin etkileri araştırılmıştır. İlk 6. ve 12. ayların sonunda brakiyal arterde

FMD ölçülmüştür. Tedavinin sonunda ivabradinin plasebo grubuna kıyasla FMD değerini artırdığı gözlenmiştir (Hohneck ve ark., 2019).

Farklı deneysel hayvan modellerinde ve klinik çalışmalarda ivabradinin endotel disfonksiyonu gelişimini önlediği ya da ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında da **ilk kez** kronik ivabradin tedavisinin diyabetik endotel disfonksiyonunu düzelttiği bulunmuştur.

2006 yılında yayınlanan bir derlemede ivabradinin kalp atım hızını azaltırken miyokardiyal kontraktiletiyi koruduğu, diyastolik dolumu artırdığı ve egzersiz sırasında küçük ve büyük koroner arterlerde vazodilatasyon sağladığı belirtilmiştir (Cargnoni ve ark., 2006). Fakat araştırmacılar ivabradinin doğrudan vazodilatasyon yapıp yapmadığını belirlemek için herhangi bir çalışma yapmamışlardır. Bu tez çalışmasında ise ilk kez ivabradinin doğrudan aort gevşetici etkisinin olup olmadığı incelenmiş ve bu etkisinin mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bu tez çalışmasında ivabradinin doğrudan gevşetici etkisinin olup olmadığı ve bu etkisinin mekanizması araştırılmıştır. KCl ve fenilefrin ile ön kasılma elde edilmiş damarlarda ivabradinin doğrudan gevşetici etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu tez çalışmasında **ilk kez** artan konsantrasyonlarda akut ivabradin uygulamasının farklı ajanlarla ön kasılma elde edilmiş sağlıklı kontrol ve STZ-diyabetik damarlarda doğrudan gevşetici etkili olduğu gösterilmiştir. KCl ile ön kasılma elde edilmiş diyabetik damarlarda ivabradinin gevşetici etkisi kontrole göre daha fazla bulunmuştur. HCN kanalı  $Na^+$  ve  $K^+$  kanallarının karışımıdır. Bu kanal fizyolojik koşullarda  $Na^+$ 'nın hücre içine,  $K^+$ 'nın ise hücre dışına geçişini sağlamaktadır (DiFrancesco, 1981). Diyabetik sıçanlarda artmış olan HCN ekspresyonları -KCl uygulaması ile aktivasyonun azalmasına bağlı olarak- KCl ile ön kasılma elde edilmiş diyabetik damarlarda ivabradinin daha fazla gevşetici etki oluşturmaya sebep olmuş olabilir. Fenilefrin ile ön kasılma elde edilmiş damarlarda, ivabradinin gevşetici etkisi tüm gruplarda benzer bulunmuştur. Bu sonuçlar, ivabradinin gevşetici etkisine farklı yolların aracılık etmesi ile açıklanabilir.

İvabradinin gevşetici etkisinin mekanizmasını aydınlatmak amacıyla kontrol ve diyabetik damarlar çeşitli ajanlarla (L-NAME, TEA ve PROP) inkübe edilerek ivabradinin gevşetici etkisi değerlendirilmiştir. L-NAME ile inkübe edilmiş kontrol ve diyabetik damarlarda ivabradinin gevşetici etkisinin ortadan kalktığı, PROP ile inkübe edilen damarlarda ise ivabradin gevşeme yanıtlarının değişmediği tespit edilmiştir. TEA ile inkübe edilen kontrol damarlarda ivabradin gevşemelerinin bazı konsantrasyonlarda kontrole kıyasla daha az olduğu bulunmuştur. TEA ile inkübe edilen diyabetik damarlarda da ivabradin gevşemeleri azalma eğilimi göstermiş ancak fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Sonuç olarak, ivabradinin kontrol ve diyabetik damarlarda gevşetici etkisine NO'nun aracılık ettiği söylenebilir. Bu çalışma ile ivabradinin gevşetici etkisinin kontrol ve diyabetik damarlarda farklı mekanizmalarla olabileceği, kontrol damarlarda K<sup>+</sup> kanalının aracılık ettiği gösterilmiştir. Ayrıca kontrol ve diyabetik damarlarda ivabradinin gevşetici etkisinde  $\beta$ -AR'lerin ise katkısının olmadığı gösterilmiştir. Yine bu tez çalışmasında **ilk kez** ivabradinin doğrudan gevşetici etkisinin mekanizması ortaya çıkarılmıştır.

Crossman'ın üçlü boyaması ile kontrol ve diyabetik sıçanların aort duvar kalınlıkları arasında fark bulunmazken, sol ventrikül duvar kalınlığı diyabetik sıçanlarda kontrole kıyasla belirgin şekilde artmıştır. Bu sonuç diyabetik sıçan atriumunda ANP ekspresyonunun artması, kalp ağırlığının beden ağırlığına oranının diyabetik sıçanlarda daha yüksek çıkması ile paralellik göstermektedir. Başka bir ifadeyle STZ-diyabetik sıçanlarda hipertrofi geliştiği birden fazla parametre üzerinden doğrulanmıştır. İvabradin tedavisi kontrol sıçanların aort ve sol ventrikül duvar kalınlığını değiştirmemiştir. İvabradin tedavili diyabetik sıçanların aort duvar kalınlığının kontrol ve diyabetik gruplara kıyasla belirgin olarak az olduğu bulunmuştur. Bu durum ivabradin tedavili diyabetik sıçanlarda kalp atım hızının azalması ile açıklanabilir. İvabradin tedavisi diyabetik sıçanların sol ventrikül duvar kalınlığını azaltma eğilimi göstermiştir. STZ-diyabetik sıçanlarda hipertrofi gelişiminin tespit edilmesi ve ivabradinin olası antihipertrofik etkisinin gösterilmesi için atriumda ANP ekspresyonu Western blot çalışması ile ölçülmüştür. Diyabette artmış olan ANP ekspresyonunun kronik ivabradin tedavisi ile azalmış olması

ivabradinin STZ-diyabetik sıçanlarda antihipertrofik etkisinin olabileceğini ortaya koymaktadır. Deneysel hipertrofi modeli oluşturulmuş H9c2 hücrelerde de ivabradinin antihipertrofik ve protektif etkili olduğu ortaya konmuştur.

STZ-diyabetik sıçanların aort duvar kalınlığının kontrol grubu ile benzer olması dikkat çekmektedir. Aşağıda bu konuda yapılan çalışmalardan bazıları özetlenmiştir. Bu çalışmalarda bir grup araştırmacı STZ-diyabetik sıçanlarda aort duvar kalınlığının azaldığını, başka bir grup araştırmacı ise arttığını bulmuştur. Sonuç olarak, STZ-diyabette aort duvar kalınlığının ne yönde değiştiği ile ilgili bir fikir birliğinin olmadığı gözlenmiştir.

Deneysel bir çalışmada erkek Sprague Dawley STZ-diyabetik sıçanlarda aort duvar kalınlığının kontrole göre azaldığı bulunmuştur (Fiordaliso ve ark., 2006). Benzer şekilde başka bir çalışmada da erkek Sprague Dawley STZ-diyabetik sıçanlarda aort duvar kalınlığının kontrole göre anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (Kinoshita ve ark., 2006). 2016 yılında yapılan bir çalışmada ise Wistar erkek STZ-diyabetik sıçanların histolojik incelemelerinde aort duvar kalınlığının kontrole göre arttığı tespit edilmiş ve bu durum ateroskleroz gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Kesavan ve ark., 2016). Jing ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada da erkek Sprague Dawley STZ-diyabetik sıçanlarda aort duvarı hematoksinle eozin ile boyanmış ve aort duvar kalınlığının kontrole göre arttığı gösterilmiştir (Jing ve ark., 2010).

Bu tez çalışması ile plazma ve serum örneklerinde SOD aktivitesi ölçülmüştür. Hem serum hem de plazmada ölçülen SOD enzim aktivitesi açısından gruplar arasında farklılık bulunmamıştır. İncelemelerin hem serum hem de plazma örneklerinde yapılması nedeniyle n sayısı yetersiz kalmıştır. Tez çalışmasında diyabet ve/veya ivabradinin oksidatif stres üzerine etkisini başka deneysel yöntemler (histolojik incelemeler) incelendiği için farklı bir ölçüm kiti ile SOD aktivitesi yeniden incelenmemiştir. Histolojik incelemelerle (DHE boyaması) diyabetik sıçanların aort ve sol ventrikül kesitlerinde süper oksit radikal miktarının kontrole kıyasla daha fazla olduğu ve ivabradin tedavisi ile süper oksit radikal miktarının

kontrol değere indiği bulunmuştur. Bu sonuç, ivabradin tedavisi ile STZ-diyabetik sıçanlarda ortaya çıkan oksidatif stresin ortadan kalktığını göstermektedir.

ApoE<sup>-/-</sup> farelerde altı haftalık ivabradin (10 mg/kg/gün) tedavisinin monosit kemotaktik protein-1 mRNA seviyesini azaltarak oksidatif stresi ortadan kaldırdığı bulunmuştur. Ayrıca yine bu çalışmada ivabradin tedavisi ile aort duvarında vasküler NADPH oksidaz aktivitesinin, süperoksit üretiminin ve lipid peroksidasyonunun azaldığı gösterilmiştir (Custodis ve ark., 2008). Hiperkolesterolemik tavşanlarda artmış olan oksidatif stresin ivabradin tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir (Koniari ve ark., 2016). Başka bir deneysel çalışmada da sıçanlarda doksurobusin ile indüklenmiş kardiyoktoksisitede ivabradin tedavisinin (10 mg/kg) kalpteki SOD ve katalaz aktivitelerini artırdığı, glutatyon peroksidaz aktivitesi ve malondialdehit seviyesini azalttığı gösterilmiştir (Colak ve ark., 2012). Özetle; ivabradinin farklı deneysel modellerde oksidatif stresi azaltıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir.

Gerçekleştirilen Western blot incelemeleri ile aort ve kalp dokusunda HCN izoformlarının varlığı ve ekspresyonunun STZ-diyabet ve/veya ivabradin tedavisinden nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Diyabetik damarlarda HCN1 ve HCN2 izoformlarının miktarı kontrole kıyasla artmıştır. HCN3 ve HCN4 izoformlarında diyabette gözlenen artış eğilimi ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Diyabette artmış olan HCN1 izoformu ivabradin tedavisi ile azalarak kontrol seviyeye inmiştir. Benzer şekilde ivabradin tedavili diyabetik damarların HCN3 ve HCN4 izoformlarının miktarı diyabetik damarlara kıyasla azalmıştır. Diyabette artmış olan HCN2 izoformu ise ivabradin tedavisi ile değişmemiştir. Kalp dokusunda (sol ventrikül ve atrium) ise; HCN izoformlarının kontrole kıyasla diyabette arttığı gösterilmiştir. Yalnızca atriumda HCN3 miktarındaki artış anlamlı bulunmamıştır. Diyabetik sıçanların sol ventrikül dokusunda artmış olan HCN1, HCN3 ve HCN4 ekspresyonlarının ivabradin tedavisi ile azaldığı gözlenmiştir. Yine benzer şekilde HCN2 izoformunun ivabradin tedavisi ile değişmediği bulunmuştur. Atriumda ise; diyabette artmış olan HCN2 ve HCN4 izoformlarının ivabradin tedavisi ile azaldığı tespit edilmiştir.

İnsan koroner arter endotelinde HCN2 ve 4 izoformlarının varlığı ve bunların akım geriliminden etkilendikleri gösterilmiştir (Kefaloyianni ve Coetzee, 2011).

Giriş bölümünde “HCN Kanallarının Ekspresyonun Değiştiği Durumlar” başlığında detaylandırıldığı gibi yapılan araştırmalarda patolojik durumlarda HCN izoformlarının ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında da ilk kez STZ-diyabetik sıçanların damar ve kalp dokularında bu izoformların diyabet ve/veya ivabradinden nasıl etkilendikleri tespit edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında HCN izoformlarının HUVEC’lerde varlığı tespit edilmiştir. İvabradinin tek başına uygulanması HCN izoformlarının miktarını değiştirmemiştir. Tek başına L-NAME uygulaması yapılan hücrelerde kontrole kıyasla HCN1 değişmemiş, HCN2 azalmış, HCN3 ve HCN4 izoformlarının miktarı ise artmıştır. L-NAME inkübasyonu ile azalan HCN2 miktarı ve artan HCN3 miktarı ivabradin varlığından etkilenmemiştir. Son olarak L-NAME inkübasyonu ile artan HCN4 ivabradin uygulaması ile azalarak kontrol değere yaklaşmıştır. Bu çalışmada L-NAME inkübasyonu sonucu HCN3 ve HCN4 miktarının artması ivabradinin endotel bağımlı gevşemelerine bu izoformlarının katkısının daha fazla olabileceğini düşündürmüştür.

HUVEC’lere tek başına ivabradin uygulanması eNOS fosforilasyonunu değiştirmezken, L-NAME uygulaması ile eNOS fosforilasyonunun kontrole kıyasla azaldığı tespit edilmiştir. L-NAME grubunda azalan bu fosforilasyon ivabradin uygulaması ile düzelmemiştir. Akut ivabradin uygulamasının azalmış olan eNOS fosforilasyonunu artıramamış olması inkübasyon süresinin yetersiz olabileceğini düşündürmüştür. Çünkü kronik ivabradin tedavisi ile diyabette azalmış olan eNOS fosforilasyonunu belirgin bir şekilde artmıştır. HUVEC’lerde L-NAME ile azalmış olan eNOS aktivasyonun ivabradin inkübasyonu ile değişmemesi, diyabetik sıçanlarda ise ivabradin tedavisinin eNOS aktivasyonunu artırmasına bağlı olarak ivabradinin sistemik etki gösterdiğini göstermektedir.

2012 yılında dislipidemik sıçanlardan elde edilen endotel hücre kültürlerinde 16 sa ivabradin (0,2-200  $\mu$ M ) inkübasyonun eNOS ya da onun aktif formu olan p-eNOS miktarını değıştirmediği bulunmuştur. Benzer şekilde, yine aynı modelde (wild type ile karşılaştırmalı olarak dislipidemik ApoE<sup>-/-</sup> fareler) uygulanan ivabradin tedavisinin ApoE<sup>-/-</sup> farelerde bozulmuş olan aortik endotelyal gevşemeleri düzelttiği, bu etkinin kalp atım sayısını azaltan bir diğer ajan olan metoprololle gerçekteşmediği gösterilmiştir. İlginç olarak, femoral arter ligasyonunu izleyen altı haftalık ivabradin tedavisi transjenik farelerde pro-arteriojenik etki göstererek kollateral perfüzyonun düzelmesine neden olmuş, bu etki eşzamanlı olarak L-NAME uygulanmasıyla ortadan kalkmıştır. Yine transjenik grupta ivabradin tedavisinin hem eNOS hem de p-eNOS ekspresyonunu artırdığı gözlenmiştir. Bu çalışmada ivabradinin in vitro doğrudan etkileri yalnızca HUVEC’lerde incelenmiştir. HUVEC’lerde akut ivabradin uygulamasının eNOS ekspresyonu ya da aktivasyonunu değıştirmediği bildirilmiştir (Schirmer ve ark., 2012).

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması, ivabradinin pleiotropik kardiyovasküler etkilerini ve bu etkilerinin moleküler mekanizmasını ortaya koymak amacıyla tasarlanmıştır. Bu çalışma kapsamında ivabradinin endotel hasar oluşumunun gözlemlendiği diyabet modelinde, endotel hasarını tedavi edici ve/veya engelleyici etkilerinin değerlendirilmesi, ivabradinin olası antihipertrofik ve antioksidatif etkilerinin incelenmesi, HCN ekspresyonlarının ivabradin tedavisinden ve diyabetten nasıl etkilendiğinin araştırılması hedeflenmiştir.

Bu hedefe yönelik olarak ivabradinin sağlıklı ve diyabetik damarlarda doğrudan etkisi tespit edilmiş ve bu etkisinin mekanizması aydınlatılmıştır. Endotel hasarı oluşturulmuş diyabetik modelde kronik ivabradin tedavisinin endotel hasarını önleyici tedavi edici etkinliği olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda ivabradinin olası antihipertrofik etkisi hem diyabetik sıçan kalbinde hem de hipertrofi modeli oluşturulmuş H9c2 hücre hattında ortaya konmuştur. Ayrıca sıçanlarda histolojik incelemelerle aort ve kalp kesitlerindeki duvar kalınlığı, NO ve oksidatif stres parametreleri incelenmiştir. HCN izoformlarının lokalizasyonları ve ekspresyonlarının STZ-diyabetten ve ivabradin tedavisinden nasıl etkilendikleri belirlenmiştir. HUVEC’lerde de bu izoformların varlığı tespit edilmiştir.

STZ-diyabet modelinde kronik metoprolol tedavisinin diyabetik kardiyomiyopatide düzelme sağladığı gösterilmiştir (Sharma ve ark., 2008). Literatür verilerine göre bu tez çalışmasında kullanılan STZ ile indüklenmiş deneysel Tip I diyabet modelinde kalp atım azalmaktadır (Hicks ve ark., 1998). Bu da, kalp atım hızını azaltıcı etkisiyle biliniyor olduğu halde ivabradinden de STZ-diyabet modelinde kardiyovasküler yararlı etkiler beklememizin nedenlerinden biridir.

İzole organ banyosu, Western blot, biyokimyasal ve histolojik incelemelerle STZ-diyabetik sıçanlarda vasküler fonksiyonların bozulduğu ve kronik ivabradin tedavisi ile STZ-diyabetik sıçanlarda endotel fonksiyonların düzeldiği ortaya

konmuştur. **İlk kez** bu çalışma kapsamında STZ-diyabet modelinde gelişen endotel disfonksiyonun kronik ivabradin tedavisi ile düzeldiği tespit edilmiştir. Bu veriler tez çalışmamızın en önemli sonuçlarından biridir. Bu çalışma kapsamında ivabradinin sadece endotel disfonksiyonu gelişmiş olan deneysel modelde bunu düzeltici etkisi değerlendirilmiştir. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarla ivabradinin endotel disfonksiyonu gelişimini önleyici etkisinin olup olmadığının da araştırılması planlanmaktadır.

Bu tez çalışmasında ilk kez sağlıklı ve STZ-diyabetik sıçanlarda ivabradinin doğrudan damar gevşetici etkisi olup olmadığı ve bu etkisine aracılık eden mekanizmalar araştırılmıştır. Farklı ajanlarla ön kasılma elde edilmiş damar preparatlarında hem kontrol hem de diyabetik damarlarda ivabradinin gevşetici etkisi olduğu tespit edilmiştir. Çalışma bir adım ileri götürülerek ivabradinin gevşetici etkisinin mekanizması araştırılmıştır. Farklı inhibitörlerle ön inkübasyon yapılan sağlıklı ve diyabetik damarlarda ivabradinin gevşetici etkisinin olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak ivabradin gevşetici etkisine NO'un ve kısmen K<sup>+</sup> kanalının aracılık ettiği ve  $\beta$  reseptörlerinin ise katkısının olmadığı gösterilmiştir.

İvabradinin gevşetici etkisinin ve pleiotropik etkilerinin mekanizmasını aydınlatmak amacıyla eNOS ve Akt proteinlerinin fosforilasyonu aort dokusunda incelenmiş ve diyabetik sıçanlarda bu proteinlerin fosforilasyonunun azaldığı bulunmuştur. İvabradin tedavisi ile eNOS fosforilasyonunun artırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ivabradininin gevşetici ve kardiyovasküler pleiotropik etkilerine bu yolağın aracılık ettiğini göstermektedir.

Histolojik incelemeler ve Western blot çalışmalarının sonucunda STZ-diyabetik sıçanlarda hipertrofi gelişimi doğrulanmıştır. Kronik ivabradin tedavisinin diyabetik sıçanların atrium dokusunda hipertrofi belirtecini belirgin bir şekilde azaltması antihipertrofik etkisinin olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda ivabradin tedavisi ile diyabetik aort kalınlığının belirgin bir şekilde azalması ivabradinin antiaterosklerotik etkili olabileceğini düşündürmüştü ve bu kapsamda daha ayrıntılı incelemeler yapılması gerektiğini göstermiştir.

Yapılacak olan kapsamlı çalışmalarla deneysel hipertrofik hayvan modelinde kronik ivabradin tedavisinin hem antihipertrofik hem de protektif etkisinin mekanizması başka belirteçler üzerinden de araştırılabilir.

Diyabetik sıçanların aort ve kalp kesitlerinde süper oksit radikal miktarı kontrole kıyasla belirgin bir şekilde artarken ivabradin tedavisi ile bu durum düzelmiştir. Böylece ivabradinin STZ-diyabetik sıçanlarda oksidatif stresi ortadan kaldırdığı sonucuna varılmıştır. Daha sonrasında yapılması planlanan çalışmalarda ivabradinin bu etkisinin moleküler mekanizması aydınlatılmaya çalışılacaktır.

HCN izoformlarının ekspresyonunun ve lokalizasyonunun ivabradinden ve STZ-diyabetten nasıl etkilendikleri araştırılmıştır. Aynı zamanda ilk kez HUVEC’lerde HCN izoformlarının varlığı bu çalışma kapsamında ortaya konmuştur. Aort ve kalp dokularında HCN izoformlarının varlığı tespit edilmiş ve HCN ekspresyonlarının diyabetik sıçanların kalp ve aort dokusunda arttığı bulunmuştur. Kronik ivabradin tedavisi diyabetik sıçanlarda HCN ekspresyonları azalmıştır. HUVEC’lerde ise L-NAME inkübasyonu bazı HCN izoformların ekspresyonunu arttırırken bazılarını azaltmıştır. İvabradinin yararlı etkilerinin HCN kanal inhibisyonundan bağımsız olup olmadığının tespit edilmesi için HCN izoformlarının genleri siRNA tekniği ile susturularak bu incelemeler tekrar yapılabilir.

Bu tez çalışmasında ivabradinin endoteldeki etkinliğinde HCN kanalları, NO, oksidatif stres ve hipertrofi arasında da ilişki olup olmadığı ortaya konmuştur.

Özet olarak, bu tez çalışması ile ivabradinin endotel hasarını engelleyici/azaltıcı ve/veya antihipertrofik pleiotropik etkilerinin gösterilmesi ABD, Kanada ve çoğu Avrupa ülkesinde zaten kullanılmakta olan ivabradinin diyabetik kardiyovasküler komplikasyonları engellemek için de kullanılabilmesine temel oluşturacaktır. İncelenecek olan başka endotel disfonksiyonu modelleri ile çalışmanın sonuçlarının desteklenmesi endotel disfonksiyona yol açan herhangi bir kardiyovasküler hastalıkta ivabradinin kullanılabilmesi için temel oluşturacaktır. İvabradinin antihipertrofik ve protektif etkilerinin gösterilmesi ile ivabradinin kalp

yetmezliğindeki etkinliğinin -kalp atım hızından bağımsız- mekanizmasına ilişkin bir fikir edinilmesini sağlamıştır.



## ÖZET

### **İvabradinin Kardiyovasküler Pleiotropik Etkilerinin ve Bu Etkilere Aracılık Eden Mekanizmaların Streptozotosin Diyabet Modelinde İncelenmesi**

İvabradin, sinoatriyal düğümde bulunan  $I_f$  (f, funny) kanalının selektif inhibitörüdür ve kalbin kontraktilesini etkilemeksizin kalp atım hızını azaltmaktadır. Günümüzde ivabradin kalp yetmezliği ve anjina pectoris tedavisinde kullanılmaktadır. Kardiyovasküler yararlı etkilerinin yalnızca kalp atım hızını azaltmasından kaynaklanmadığını gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır fakat, bu etkilerin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Eldeki veriler, ivabradinin pleiotropik kardiyovasküler etkilerine endotel hasarını engellemesinin katkısı olduğuna işaret etmekte, bunu da oksidatif stresi azaltmasıyla ilişkilendirmektedir. Bu tez çalışmasında ivabradinin sağlıklı ve diyabetik damarlarda vasküler yanıtları nasıl etkilediği ve bu etkiye aracılık eden mekanizmaların, antioksidatif ve antihipertrofik etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Diyabette endotel disfonksiyonu gelişmektedir. Bu nedenle ivabradinin endotel hasarını tedavi edici/engelleme etkisini değerlendirmek için diyabetik endotel disfonksiyon modeli seçilmiştir. Bu çalışmada diyabette gelişen endotel disfonksiyonu çeşitli deneysel yöntemlerle doğrulanmıştır. İvabradinin kardiyovasküler pleiotropik etkilerinin mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik olarak kalp ve damar kesitlerinde NO ve süperoksit miktar tayini floresan görüntüleme yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Benzer incelemeler insan endotel hücre serisi olan HUVEC'lerde de gerçekleştirilmiştir. Diyabetik kardiyovasküler komplikasyonlardan biri de ventrikül hipertrofisidir ve bu, deneysel model olan STZ-diyabette de ortaya çıkmaktadır. İvabradinin antihipertrofik etkisinin değerlendirmesi deneysel hipertrofi modeli oluşturulmuş H9c2 hücrelerde ve STZ-diyabetik sıçan kalbinde morfolojik olarak ve marker proteinlerden biri olan ANP protein düzeyinin belirlenmesiyle gerçekleştirilmiştir. HCN kanalının dağılımları türe ve dokuya göre farklılık göstermekte ve hipertansiyon, hipertrofi gibi bazı patolojik durumlarda ekspresyonları farklılaşmaktadır. HCN kanallarının diyabetten ve kronik ivabradin tedavisinden etkilenip etkilenmediklerinin araştırılması amacıyla sıçan damar ve kalbinde HCN izoformlarının düzeyi belirlenmiştir. Benzer bir çalışma HUVEC'lerde bazal koşullarda HCN ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Aynı zamanda HCN ekspresyonlarının ivabradin ve L-NAME uygulamasından nasıl etkilendikleri değerlendirilmiştir. Bu çalışma ile diyabette gelişen endotel disfonksiyonun kronik ivabradin tedavisi ile düzeldiği ortaya konmuştur. Ayrıca ivabradinin damar gevşetici etkisinin mekanizması belirlenmiştir. STZ-diyabetik sıçanlarda ivabradinin antihipertrofik ve antioksidatif etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Böylece ivabradinin STZ-diyabet modelinde ivabradinin pleiotropik kardiyovasküler yararlı etkilerine aracılık eden mekanizmalar belirlenmiştir. Sonuç olarak ivabradinin diyabetik endotel disfonksiyonu iyileştirdiği ve bu etkiye ivabradinin antioksidatif, antihipertrofik etkilerinin de aracılık ettiği tespit edilmiştir. Böylece bu çalışma ile ivabradinin pleiotropik kardiyovasküler yararlı etkilerine aracılık eden mekanizmalar hakkında fikir edinilmiştir. Anjina hastalarının önemli bir alt grubunu, sayıları her yıl artan diyabetik hastalar oluşturmaktadır. Bu nedenle, ivabradin etkinliğinin bu hasta grubunda değerlendirilmesi önemlidir. İvabradinin endotel hasarını engelleyici/azaltıcı ve/veya antihipertrofik pleiotropik etkilerinin gösterilmesi ABD, Kanada ve çoğu Avrupa ülkesinde zaten kullanılmakta olan ivabradinin diyabetik kardiyovasküler komplikasyonları engellemek için de kullanılabilmesine temel oluşturacaktır.

**Anahtar Sözcükler:** Endotel Disfonksiyon, Hipertrofi, İvabradin, Pleiotropik Etki, STZ-diyabet.

## SUMMARY

### **Investigation of the Cardiovascular Pleiotropic Effects and Mechanisms of Ivabradine in Streptozotocin-Induced Diabetes Model**

Ivabradine is a selective inhibitor of  $I_f$  (f, funny) channel in the sinoatrial node and reduces heart rate without affecting the contractility of the heart. Today, ivabradine is used in the treatment of heart failure and angina pectoris. There are many studies showing that cardiovascular beneficial effects are not only due to decreasing heart rate, but, mechanism of these effects have not been fully elucidated. Current data indicated that the pleiotropic cardiovascular effects may be related to prevention of endothelial injury associated with a reduction of oxidative stress by ivabradine. In this thesis, it is aimed to determine how ivabradine affects vascular responses in healthy and diabetic vessels and whether the antioxidative and antihypertrophic effects of ivabradine involve its vascular impact. Diabetes causes endothelial injury. Therefore, diabetic endothelial dysfunction model was selected to investigate preventive or reversing effect of the drug on endothelial injury. In this study, endothelial dysfunction in diabetes has been confirmed by various experimental methods. In order to elucidate the mechanism of cardiovascular pleiotropic effects of ivabradine, NO content and superoxide production was performed by fluorescence imaging in cardiac and vascular sections. Similar studies were carried out on human endothelial cell line (HUVEC). Ventricular hypertrophy, another cardiovascular complication of diabetes also is a characteristic property of STZ-induced diabetic experimental model. Evaluation of the antihypertrophic effect of ivabradine was carried out morphologically by determining the ANP protein level, one of the marker proteins, in experimental hypertrophy model in H9c2 cells and STZ-diabetic rat hearts. HCN channel expression depends on the species and tissue and it also differs in certain pathologies such as hypertension and hypertrophy. In order to investigate how HCN channels are affected by diabetes or chronic ivabradine treatment, the level of HCN isoforms in rat vascular and cardiac tissues has been determined. A similar study was conducted to determine HCN expression in basal conditions in HUVEC. Besides, it was evaluated that how HCN expressions were affected in ivabradine and L-NAME administration. With this study, it has been demonstrated that diabetic endothelial dysfunction ameliorates with chronic ivabradine treatment. In addition, the mechanism of the vasodilating effect of ivabradine is determined. It has been determined that ivabradine has antihypertrophic and antioxidative effects in STZ-diabetic rats. The presence of HCN channel isoforms and expression diversity have been demonstrated. Thus, mechanisms mediating the pleiotropic cardiovascular beneficial effects of ivabradine in the STZ-diabetes model of ivabradine were determined. As a result, it has been determined that ivabradine improves diabetic endothelial dysfunction and mediated by the antioxidative and antihypertrophic effects of ivabradine. Thus, with this study, an idea was obtained about the mechanisms mediating pleiotropic cardiovascular beneficial effects of ivabradine. An important sub-group of patients with angina are diabetic patients, whose numbers are increasing every year. Therefore, it is important to evaluate the efficiency of ivabradine in these patient. To document pleiotropic effects such as preventing or reversing endothelial injury and/or hypertrophy will create a strong basis for utilizing ivabradine-an already approved drug in US, Canada and many European countries- in the prevention of diabetic cardiovascular complications.

**Keywords:** Endothelial Dysfunction, Hypertrophy, Ivabradine, Pleiotropic Effect, STZ-diabetes.

## KAYNAKLAR

- ACCILI EA, PROENZA C, BARUSCOTTI M & DIFRANCESCO D (2002). From funny current to HCN channels: 20 years of excitation. *News Physiol Sci*, **17**: 32-7.
- ALTABAS V (2015). Diabetes, Endothelial Dysfunction, and Vascular Repair: What Should a Diabetologist Keep His Eye on? *Int J Endocrinol*, **2015**: 848272.
- ALTOMARE C, BUCCHI A, CAMATINI E, BARUSCOTTI M, VISCOMI C, MORONI A & DIFRANCESCO D (2001). Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *J Gen Physiol*, **117**: 519-32.
- ALTOMARE C, TERRAGNI B, BRIOSCHI C, MILANESI R, PAGLIUCA C, VISCOMI C, MORONI A, BARUSCOTTI M & DIFRANCESCO D (2003). Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol*, **549**: 347-59.
- ANDREWS TC, FENTON T, TOYOSAKI N, GLASSER SP, YOUNG PM, MACCALLUM G, GIBSON RS, SHOOK TL & STONE PH (1993). Subsets of ambulatory myocardial ischemia based on heart rate activity. Circadian distribution and response to anti-ischemic medication. The Angina and Silent Ischemia Study Group (ASIS). *Circulation*, **88**: 92-100.
- ARTHUR-ATAAM J, BIDEAUX P, CHARRABI A, SICARD P, FROMY B, LIU K, EDDAHIBI S, PASQUALIN C, JOUY N, RICHARD S & VIRSOLVY A (2019). Dietary Supplementation with Silicon-Enriched Spirulina Improves Arterial Remodeling and Function in Hypertensive Rats. *Nutrients*, **11**.
- ATKINSON MA, EISENBARTH GS & MICHELS AW (2014). Type 1 diabetes. *Lancet*, **383**: 69-82.
- BANKS MI, PEARCE RA & SMITH PH (1993). Hyperpolarization-activated cation current (I<sub>h</sub>) in neurons of the medial nucleus of the trapezoid body: voltage-clamp analysis and enhancement by norepinephrine and cAMP suggest a modulatory mechanism in the auditory brain stem. *J Neurophysiol*, **70**: 1420-32.
- BARUSCOTTI M, BUCCHI A & DIFRANCESCO D (2005). Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. *Pharmacol Ther*, **107**: 59-79.
- BAUMHAKEL M, CUSTODIS F, SCHLIMMER N, LAUFS U & BOHM M (2010). Heart rate reduction with ivabradine improves erectile dysfunction in parallel to decrease in atherosclerotic plaque load in ApoE-knockout mice. *Atherosclerosis*, **212**: 55-62.
- BEERE PA, GLAGOV S & ZARINS CK (1984). Retarding effect of lowered heart rate on coronary atherosclerosis. *Science*, **226**: 180-2.

- BIEL M, SAUTTER A, LUDWIG A, HOFMANN F & ZONG X (1998). Cyclic nucleotide-gated channels--mediators of NO:cGMP-regulated processes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **358**: 140-4.
- BIEL M, SCHNEIDER A & WAHL C (2002). Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med*, **12**: 206-12.
- BOHM M, REIL JC, DEEDWANIA P, KIM JB & BORER JS (2015). Resting heart rate: risk indicator and emerging risk factor in cardiovascular disease. *Am J Med*, **128**: 219-28.
- BOHM M, SWEDBERG K, KOMAJDA M, BORER JS, FORD I, DUBOST-BRAMA A, LEREBOURS G, TAVAZZI L & INVESTIGATORS S (2010). Heart rate as a risk factor in chronic heart failure (SHIFT): the association between heart rate and outcomes in a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, **376**: 886-94.
- BOIS P, BESCOND J, RENAUDON B & LENFANT J (1996). Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol*, **118**: 1051-7.
- BORER JS & TARDIF JC (2010). Efficacy of ivabradine, a selective I(f) inhibitor, in patients with chronic stable angina pectoris and diabetes mellitus. *Am J Cardiol*, **105**: 29-35.
- BORGHETTI G, VON LEWINSKI D, EATON DM, SOURIJ H, HOUSER SR & WALLNER M (2018). Diabetic Cardiomyopathy: Current and Future Therapies. Beyond Glycemic Control. *Front Physiol*, **9**: 1514.
- BORLAK J & THUM T (2003). Hallmarks of ion channel gene expression in end-stage heart failure. *FASEB J*, **17**: 1592-608.
- BUCCHI A, BARUSCOTTI M & DIFRANCESCO D (2002). Current-dependent block of rabbit sino-atrial node I(f) channels by ivabradine. *J Gen Physiol*, **120**: 1-13.
- BUGGER H & ABEL ED (2014). Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia*, **57**: 660-71.
- CAETANO J & ALVES JD (2015). Heart rate and cardiovascular protection. *European Journal of Internal Medicine*, **26**: 217-222.
- CANET E, LEREBOURS G & VILAINE JP (2011). Innovation in coronary artery disease and heart failure: clinical benefits of pure heart rate reduction with ivabradine. *Ann N Y Acad Sci*, **1222**: 90-9.
- CAO X, SUN Z, ZHANG B, LI X & XIA H (2016). The Effects of Ivabradine on Cardiac Function after Myocardial Infarction are Weaker in Diabetic Rats. *Cell Physiol Biochem*, **39**: 2055-2064.

- CARGNONI A, CECONI C, STAVROULA G & FERRARI R (2006). Heart rate reduction by pharmacological If current inhibition. *Adv Cardiol*, **43**: 31-44.
- CERBAI E, BARBIERI M & MUGELLI A (1994). Characterization of the hyperpolarization-activated current, I(f), in ventricular myocytes isolated from hypertensive rats. *J Physiol*, **481** ( Pt 3): 585-91.
- CERBAI E, BARBIERI M & MUGELLI A (1996). Occurrence and properties of the hyperpolarization-activated current If in ventricular myocytes from normotensive and hypertensive rats during aging. *Circulation*, **94**: 1674-81.
- CERBAI E & MUGELLI A (2006). I(f) in non-pacemaker cells: role and pharmacological implications. *Pharmacol Res*, **53**: 416-23.
- CERBAI E, PINO R, PORCIATTI F, SANI G, TOSCANO M, MACCHERINI M, GIUNTI G & MUGELLI A (1997). Characterization of the hyperpolarization-activated current, I(f), in ventricular myocytes from human failing heart. *Circulation*, **95**: 568-71.
- CERBAI E, SARTIANI L, DE PAOLI P & MUGELLI A (2000). Isolated cardiac cells for electropharmacological studies. *Pharmacol Res*, **42**: 1-8.
- CERBAI E, SARTIANI L, DEPAOLI P, PINO R, MACCHERINI M, BIZZARRI F, DICIOLLA F, DAVOLI G, SANI G & MUGELLI A (2001). The properties of the pacemaker current I(F) in human ventricular myocytes are modulated by cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol*, **33**: 441-8.
- CHATZIZISIS YS & GIANNOGLOU GD (2011). Importance of local hemodynamic conditions in the atherosclerotic effect of increased heart rate. *J Am Coll Cardiol*, **57**: 2206; author reply 2206.
- CHEN SL, HU ZY, ZUO GF, LI MH & LI B (2014). I(f) current channel inhibitor (ivabradine) deserves cardioprotective effect via down-regulating the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and attenuating apoptosis in diabetic mice. *BMC Cardiovasc Disord*, **14**: 150.
- COLAK MC, PARLAKPINAR H, TASDEMIR S, SAMDANCI E, KOSE E, POLAT A, SARIHAN E & ACET A (2012). Therapeutic effects of ivabradine on hemodynamic parameters and cardiotoxicity induced by doxorubicin treatment in rat. *Hum Exp Toxicol*, **31**: 945-54.
- COLIN P, GHALEH B, MONNET X, HITTINGER L & BERDEAUX A (2004). Effect of graded heart rate reduction with ivabradine on myocardial oxygen consumption and diastolic time in exercising dogs. *J Pharmacol Exp Ther*, **308**: 236-40.
- CRAVEN KB & ZAGOTTA WN (2006). CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu Rev Physiol*, **68**: 375-401.

- CROSSMON G (1937). A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *The Anatomical Record*, **69**: 33-38.
- CUCHERAT M (2007). Quantitative relationship between resting heart rate reduction and magnitude of clinical benefits in post-myocardial infarction: a meta-regression of randomized clinical trials. *European Heart Journal*, **28**: 3012-3019.
- CUSTODIS F, BAUMHAKEL M, SCHLIMMER N, LIST F, GENSCHE C, BOHM M & LAUFS U (2008). Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, **117**: 2377-87.
- CUSTODIS F, SCHIRMER SH, BAUMHAKEL M, HEUSCH G, BOHM M & LAUFS U (2010). Vascular pathophysiology in response to increased heart rate. *J Am Coll Cardiol*, **56**: 1973-83.
- CUTTLE MF, RUSZNAK Z, WONG AY, OWENS S & FORSYTHE ID (2001). Modulation of a presynaptic hyperpolarization-activated cationic current (I<sub>h</sub>) at an excitatory synaptic terminal in the rat auditory brainstem. *J Physiol*, **534**: 733-44.
- DEMONTIS GC, MORONI A, GRAVANTE B, ALTOMARE C, LONGONI B, CERVETTO L & DIFRANCESCO D (2002). Functional characterisation and subcellular localisation of HCN1 channels in rabbit retinal rod photoreceptors. *J Physiol*, **542**: 89-97.
- DIFRANCESCO D (1981). A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J Physiol*, **314**: 359-76.
- DIFRANCESCO D (1991). The contribution of the 'pacemaker' current (I<sub>f</sub>) to generation of spontaneous activity in rabbit sino-atrial node myocytes. *J Physiol*, **434**: 23-40.
- DIFRANCESCO D (1993). Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol*, **55**: 455-72.
- DIFRANCESCO D (1995). The onset and autonomic regulation of cardiac pacemaker activity: relevance of the I<sub>f</sub> current. *Cardiovasc Res*, **29**: 449-56.
- DIFRANCESCO D & TORTORA P (1991). Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*, **351**: 145-7.
- DOAN TN & KUNZE DL (1999). Contribution of the hyperpolarization-activated current to the resting membrane potential of rat nodose sensory neurons. *J Physiol*, **514 ( Pt 1)**: 125-38.
- DOAN TN, STEPHANS K, RAMIREZ AN, GLAZEBROOK PA, ANDRESEN MC & KUNZE DL (2004). Differential distribution and function of hyperpolarization-activated channels in sensory neurons and mechanosensitive fibers. *J Neurosci*, **24**: 3335-43.

- DOBRZYNSKI H, NIKOLSKI VP, SAMBELASHVILI AT, GREENER ID, YAMAMOTO M, BOYETT MR & EFIMOV IR (2003). Site of origin and molecular substrate of atrioventricular junctional rhythm in the rabbit heart. *Circ Res*, **93**: 1102-10.
- DROUIN A, GENDRON ME, THORIN E, GILLIS MA, MAHLBERG-GAUDIN F & TARDIF JC (2008). Chronic heart rate reduction by ivabradine prevents endothelial dysfunction in dyslipidaemic mice. *Br J Pharmacol*, **154**: 749-57.
- DYER AR, PERSKY V, STAMLER J, PAUL O, SHEKELLE RB, BERKSON DM, LEPPER M, SCHOENBERGER JA & LINDBERG HA (1980). Heart rate as a prognostic factor for coronary heart disease and mortality: findings in three Chicago epidemiologic studies. *Am J Epidemiol*, **112**: 736-49.
- EAGLE KA, LIM MJ, DABBOUS OH, PIEPER KS, GOLDBERG RJ, VAN DE WERF F, GOODMAN SG, GRANGER CB, STEG PG, GORE JM, BUDAJ A, AVEZUM A, FLATHER MD, FOX KA & INVESTIGATORS G (2004). A validated prediction model for all forms of acute coronary syndrome: estimating the risk of 6-month postdischarge death in an international registry. *JAMA*, **291**: 2727-33.
- FALA L (2016). Corlanor (Ivabradine), First HCN Channel Blocker, FDA Approved for the Treatment of Patients with Heart Failure. *Am Health Drug Benefits*, **9**: 56-9.
- FERNANDEZ-VELASCO M, GOREN N, BENITO G, BLANCO-RIVERO J, BOSCA L & DELGADO C (2003). Regional distribution of hyperpolarization-activated current (I<sub>f</sub>) and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel mRNA expression in ventricular cells from control and hypertrophied rat hearts. *J Physiol*, **553**: 395-405.
- FERRARI R & CECONI C (2011). Selective and specific I<sub>f</sub> inhibition with ivabradine: new perspectives for the treatment of cardiovascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, **9**: 959-73.
- FIORDALISO F, CUCCOVILLO I, BIANCHI R, BAI A, DONI M, SALIO M, DE ANGELIS N, GHEZZI P, LATINI R & MASSON S (2006). Cardiovascular oxidative stress is reduced by an ACE inhibitor in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Life Sci*, **79**: 121-9.
- FLANNERY G, GEHRIG-MILLS R, BILLAH B & KRUM H (2008). Analysis of randomized controlled trials on the effect of magnitude of heart rate reduction on clinical outcomes in patients with systolic chronic heart failure receiving beta-blockers. *Am J Cardiol*, **101**: 865-9.
- FORSTERMANN U & MUNZEL T (2006). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, **113**: 1708-14.
- FOX K, FORD I, STEG PG, TENDERA M, FERRARI R & INVESTIGATORS B (2008a). Ivabradine for patients with stable coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, **372**: 807-16.

- FOX K, FORD I, STEG PG, TENDERA M, ROBERTSON M, FERRARI R & INVESTIGATORS B (2008b). Heart rate as a prognostic risk factor in patients with coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a subgroup analysis of a randomised controlled trial. *Lancet*, **372**: 817-21.
- FRANKE J, SCHMAHL D, LEHRKE S, PRIBE R, BEKEREDJIAN R, DOESCH AO, EHLERMANN P, SCHNABEL P, KATUS HA & ZUGCK C (2011). Adjuvant Use of Ivabradine in Acute Heart Failure due to Myocarditis. *Case Rep Med*, **2011**: 203690.
- FURCHGOTT RF & ZAWADZKI JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**: 373-6.
- GAO L & MANN GE (2009). Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signalling. *Cardiovasc Res*, **82**: 9-20.
- GARDINER SM, KEMP PA, MARCH JE & BENNETT T (1995). Acute and chronic cardiac and regional haemodynamic effects of the novel bradycardic agent, S16257, in conscious rats. *Br J Pharmacol*, **115**: 579-86.
- GIL-ORTEGA M, CONDEZO-HOYOS L, GARCIA-PRIETO CF, ARRIBAS SM, GONZALEZ MC, ARANGUEZ I, RUIZ-GAYO M, SOMOZA B & FERNANDEZ-ALFONSO MS (2014). Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates long-term high-fat diet-derived endothelial dysfunction. *PLoS One*, **9**: e95312.
- HALCOX JP, NARAYANAN S, CRAMER-JOYCE L, MINCEMOYER R & QUYYUMI AA (2001). Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human forearm microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **280**: H2470-7.
- HERRMANN S, LAYH B & LUDWIG A (2011). Novel insights into the distribution of cardiac HCN channels: an expression study in the mouse heart. *J Mol Cell Cardiol*, **51**: 997-1006.
- HEUSCH G (2008). Pleiotropic action(s) of the bradycardic agent ivabradine: cardiovascular protection beyond heart rate reduction. *Br J Pharmacol*, **155**: 970-1.
- HEUSCH G, SKYSCHALLY A, GRES P, VAN CASTER P, SCHILAWA D & SCHULZ R (2008). Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of infarct size with ivabradine: protection beyond heart rate reduction. *Eur Heart J*, **29**: 2265-75.
- HICKS KK, SEIFEN E, STIMERS JR & KENNEDY RH (1998). Effects of streptozotocin-induced diabetes on heart rate, blood pressure and cardiac autonomic nervous control. *J Auton Nerv Syst*, **69**: 21-30.

- HIRAMATSU M, FURUKAWA T, SAWANOBORI T & HIRAOKA M (2002). Ion channel remodeling in cardiac hypertrophy is prevented by blood pressure reduction without affecting heart weight increase in rats with abdominal aortic banding. *J Cardiovasc Pharmacol*, **39**: 866-74.
- HOFMANN F, FABRITZ L, STIEBER J, SCHMITT J, KIRCHHOF P, LUDWIG A & HERRMANN S (2012). Ventricular HCN channels decrease the repolarization reserve in the hypertrophic heart. *Cardiovasc Res*, **95**: 317-26.
- HOHNECK AL, FRIES P, STRODER J, SCHNEIDER G, WAGENPFEIL S, SCHIRMER SH, BOHM M, LAUFS U & CUSTODIS F (2019). Effects of heart rate reduction with ivabradine on vascular stiffness and endothelial function in chronic stable coronary artery disease. *J Hypertens*, **37**: 1023-1031.
- HOPPE UC, JANSEN E, SUDKAMP M & BEUCKELMANN DJ (1998). Hyperpolarization-activated inward current in ventricular myocytes from normal and failing human hearts. *Circulation*, **97**: 55-65.
- HOWARTH FC, AL-SHARHAN R, AL-HAMMADI A & QURESHI MA (2007). Effects of streptozotocin-induced diabetes on action potentials in the sinoatrial node compared with other regions of the rat heart. *Mol Cell Biochem*, **300**: 39-46.
- HUANG PL (2009). eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends Endocrinol Metab*, **20**: 295-302.
- HUANG X, ZHONG N, ZHANG H, MA A, YUAN Z & GUO N (2016). Reduced expression of HCN channels in the sinoatrial node of streptozotocin-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol*: 1-9.
- HUYNH K, BERNARDO BC, MCMULLEN JR & RITCHIE RH (2014). Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways. *Pharmacol Ther*, **142**: 375-415.
- INGRAM SL & WILLIAMS JT (1996). Modulation of the hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) by cyclic nucleotides in guinea-pig primary afferent neurons. *J Physiol*, **492 ( Pt 1)**: 97-106.
- JING YH, CHEN KH, YANG SH, KUO PC & CHEN JK (2010). Resveratrol ameliorates vasculopathy in STZ-induced diabetic rats: role of AGE-RAGE signalling. *Diabetes Metab Res Rev*, **26**: 212-22.
- JOHNSTONE MT, CREAGER SJ, SCALES KM, CUSCO JA, LEE BK & CREAGER MA (1993). Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*, **88**: 2510-6.
- JUNG G (2012). Fluorescent Proteins II: Application of Fluorescent Protein Technology. **12**: 163-182.

- KALLISTRATOS MS, POULIMENOS LE & MANOLIS AJ (2017). Stable angina pectoris: which drugs or combinations to use in which patients. *e-Journal of Cardiology Practice*, **15**. [Electronic Journal] Erişim Adresi: [<https://www.escardio.org/Journals/E-Journal-of-Cardiology-Practice/Volume-15/Stable-angina-pectoris-which-drugs-or-combinations-to-use-in-which-patients>] Erişim Tarihi: 19/05/2020.
- KANNEL WB, KANNEL C, PAFFENBARGER RS, JR. & CUPPLES LA (1987). Heart rate and cardiovascular mortality: the Framingham Study. *Am Heart J*, **113**: 1489-94.
- KAUPP UB & SEIFERT R (2001). Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol*, **63**: 235-57.
- KEANEY JF, JR., MASSARO JM, LARSON MG, VASAN RS, WILSON PW, LIPINSKA I, COREY D, SUTHERLAND P, VITA JA & BENJAMIN EJ (2004). Heritability and correlates of intercellular adhesion molecule-1 in the Framingham Offspring Study. *J Am Coll Cardiol*, **44**: 168-73.
- KEFALOYIANNI E & COETZEE WA (2011). Transcriptional remodeling of ion channel subunits by flow adaptation in human coronary artery endothelial cells. *J Vasc Res*, **48**: 357-67.
- KESAVAN R, CHANDEL S, UPADHYAY S, BENDRE R, GANUGULA R, POTUNURU UR, GIRI H, SAHU G, KUMAR PU, REDDY GB, JOKSIC G, BERA AK & DIXIT M (2016). Gentiana lutea exerts anti-atherosclerotic effects by preventing endothelial inflammation and smooth muscle cell migration. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, **26**: 293-301.
- KIM JA, MONTAGNANI M, KOH KK & QUON MJ (2006). Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*, **113**: 1888-904.
- KING GL, PARK K & LI Q (2016). Selective Insulin Resistance and the Development of Cardiovascular Diseases in Diabetes: The 2015 Edwin Bierman Award Lecture. *Diabetes*, **65**: 1462-71.
- KINLAY S, BEHRENDT D, WAINSTEIN M, BELTRAME J, FANG JC, CREAGER MA, SELWYN AP & GANZ P (2001). Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation*, **104**: 1114-8.
- KINOSHITA Y, SAITO M, SATOH I, SHOMORI K, SUZUKI H, YAMADA M, KONO T & SATOH K (2006). General administration of cyclohexenonic long-chain fatty alcohol ameliorates hyperreactivity of STZ-induced diabetic rat aorta. *Life Sci*, **78**: 1508-14.
- KITADA M, ZHANG Z, MIMA A & KING GL (2010). Molecular mechanisms of diabetic vascular complications. *J Diabetes Investig*, **1**: 77-89.

- KLEINBONGARD P, GEDIK N, WITTING P, FREEDMAN B, KLOCKER N & HEUSCH G (2015). Pleiotropic, heart rate-independent cardioprotection by ivabradine. *Br J Pharmacol*, **172**: 4380-90.
- KNAPP M, TU X & WU R (2019). Vascular endothelial dysfunction, a major mediator in diabetic cardiomyopathy. *Acta Pharmacol Sin*, **40**: 1-8.
- KOFO-ABAYOMI A & LUCAS PD (1988). A comparison between atria from control and streptozotocin-diabetic rats: the effects of dietary myoinositol. *Br J Pharmacol*, **93**: 3-8.
- KOMAJDA M (2013). Novel approaches to heart rate modulation in chronic heart failure. *Kardiol Pol*, **71**: 549-51.
- KOMAJDA M (2016). Ivabradine. *Handb Exp Pharmacol*.
- KONDRAT'EV AI, DOLGIKH VT & STOTSKII AO (2010). Efficacy of ivabradine in combination therapy for complicated acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ter Arkh*, **82**: 27-31.
- KONIARI I, MAVRILAS D, APOSTOLAKIS E, PAPADIMITRIOU E, PAPADAKI H, PAPALOIS A, POIMENIDI E, XANTHOPOULOU I, HAHALIS G & ALEXOPOULOS D (2016). Inhibition of Atherosclerosis Progression, Intimal Hyperplasia, and Oxidative Stress by Simvastatin and Ivabradine May Reduce Thoracic Aorta's Stiffness in Hypercholesterolemic Rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, **21**: 412-22.
- KOYAMA T, KIMURA C, PARK SJ, OIKE M & ITO Y (2002). Functional implications of Ca<sup>2+</sup> mobilizing properties for nitric oxide production in aortic endothelium. *Life Sci*, **72**: 511-20.
- KROLLER-SCHON S, SCHULZ E, WENZEL P, KLESCHYOV AL, HORTMANN M, TORZEWSKI M, OELZE M, RENNE T, DAIBER A & MUNZEL T (2011). Differential effects of heart rate reduction with ivabradine in two models of endothelial dysfunction and oxidative stress. *Basic Res Cardiol*, **106**: 1147-58.
- LECHAT P, HULOT JS, ESCOLANO S, MALLET A, LEIZOROVICZ A, WERHLEN-GRANDJEAN M, POCHMALICKI G & DARGIE H (2001). Heart rate and cardiac rhythm relationships with bisoprolol benefit in chronic heart failure in CIBIS II Trial. *Circulation*, **103**: 1428-33.
- LI YL (2013). Angiotensin II-Superoxide Signaling and Arterial Baroreceptor Function in Type-1 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Metab*, **Suppl 12**: 1-6.
- LI YL, TRAN TP, MUELLEMAN R & SCHULTZ HD (2008). Blunted excitability of aortic baroreceptor neurons in diabetic rats: involvement of hyperpolarization-activated channel. *Cardiovasc Res*, **79**: 715-21.

- LIANG D, ZHONG P, HU J, LIN F, QIAN Y, XU Z, WANG J, ZENG C, LI X & LIANG G (2015). EGFR inhibition protects cardiac damage and remodeling through attenuating oxidative stress in STZ-induced diabetic mouse model. *J Mol Cell Cardiol*, **82**: 63-74.
- LIU Y, QI H, WANG Y, WU M, CAO Y, HUANG W, LI L, JI Z & SUN H (2012). Allicin protects against myocardial apoptosis and fibrosis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, **19**: 693-8.
- LUDWIG A, ZONG X, JEGLITSCH M, HOFMANN F & BIEL M (1998). A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*, **393**: 587-91.
- MA ZG, YUAN YP, XU SC, WEI WY, XU CR, ZHANG X, WU QQ, LIAO HH, NI J & TANG QZ (2017). CTRP3 attenuates cardiac dysfunction, inflammation, oxidative stress and cell death in diabetic cardiomyopathy in rats. *Diabetologia*, **60**: 1126-1137.
- MANGIACAPRA F, COLAIORI I, RICOTTINI E, BALDUCCI F, CRETA A, DEMARTINI C, MINOTTI G & DI SCIASCIO G (2017). Heart Rate reduction by Ivabradine for improvement of ENDothELial function in patients with coronary artery disease: the RIVENDEL study. *Clin Res Cardiol*, **106**: 69-75.
- MCVEIGH GE, BRENNAN GM, JOHNSTON GD, MCDERMOTT BJ, MCGRATH LT, HENRY WR, ANDREWS JW & HAYES JR (1992). Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, **35**: 771-6.
- MEIGS JB, HU FB, RIFAI N & MANSON JE (2004). Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, **291**: 1978-86.
- MEIGS JB, MITTLEMAN MA, NATHAN DM, TOFLER GH, SINGER DE, MURPHY-SHEEHY PM, LIPINSKA I, D'AGOSTINO RB & WILSON PW (2000). Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis: the Framingham Offspring Study. *JAMA*, **283**: 221-8.
- MONCADA S, HIGGS EA & VANE JR (1977). Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin x), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet*, **1**: 18-20.
- MONTAGNANI M, GOLOVCHENKO I, KIM I, KOH GY, GOALSTONE ML, MUNDHEKAR AN, JOHANSEN M, KUCIK DF, QUON MJ & DRAZNIN B (2002). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J Biol Chem*, **277**: 1794-9.
- MOOSMANG S, BIEL M, HOFMANN F & LUDWIG A (1999). Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol Chem*, **380**: 975-80.

- MOOSMANG S, STIEBER J, ZONG X, BIEL M, HOFMANN F & LUDWIG A (2001). Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem*, **268**: 1646-52.
- MULDER P, BARBIER S, CHAGRAOUI A, RICHARD V, HENRY JP, LALLEMAND F, RENET S, LEREBOURS G, MAHLBERG-GAUDIN F & THUILLEZ C (2004). Long-term heart rate reduction induced by the selective I(f) current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. *Circulation*, **109**: 1674-9.
- MUNK AA, ADJEMIAN RA, ZHAO J, OGBAGHEBRIEL A & SHRIER A (1996). Electrophysiological properties of morphologically distinct cells isolated from the rabbit atrioventricular node. *J Physiol*, **493 ( Pt 3)**: 801-18.
- MURRAY KT (2013). It's a funny thing. *J Cardiovasc Electrophysiol*, **24**: 1401-2.
- NERBONNE JM & KASS RS (2005). Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*, **85**: 1205-53.
- NERLA R, DI FRANCO A, MILO M, PITOCCHO D, ZACCARDI F, TARZIA P, SARULLO FM, VILLANO A, RUSSO G, STAZI A, GHIRLANDA G, LANZA GA & CREA F (2012). Differential effects of heart rate reduction by atenolol or ivabradine on peripheral endothelial function in type 2 diabetic patients. *Heart*, **98**: 1812-6.
- NICOLLS MR, HASKINS K & FLORES SC (2007). Oxidant stress, immune dysregulation, and vascular function in type I diabetes. *Antioxid Redox Signal*, **9**: 879-89.
- ONO K, SHIBATA S & IJIMA T (2003). Pacemaker mechanism of porcine sino-atrial node cells. *J Smooth Muscle Res*, **39**: 195-204.
- PAN Y, WANG Y, ZHAO Y, PENG K, LI W, WANG Y, ZHANG J, ZHOU S, LIU Q, LI X, CAI L & LIANG G (2014). Inhibition of JNK phosphorylation by a novel curcumin analog prevents high glucose-induced inflammation and apoptosis in cardiomyocytes and the development of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*, **63**: 3497-511.
- PARAKH N & BHARGAVA B (2011). Rate control with ivabradine: angina pectoris and beyond. *Am J Cardiovasc Drugs*, **11**: 1-12.
- PERRET-GUILLAUME C, JOLY L & BENETOS A (2009). Heart rate as a risk factor for cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis*, **52**: 6-10.
- POSTEA O & BIEL M (2011). Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov*, **10**: 903-14.
- PSOTKA MA & TEERLINK JR (2016). Ivabradine: Role in the Chronic Heart Failure Armamentarium. *Circulation*, **133**: 2066-75.

- QIN WD, LIU GL, WANG J, WANG H, ZHANG JN, ZHANG F, MA Y, JI XY, LI C & ZHANG MX (2016). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibition protects cardiomyocytes from inflammation and apoptosis in diabetic cardiomyopathy. *Oncotarget*, **7**: 35618-35631.
- RAJENDRAN P, RENGARAJAN T, THANGAVEL J, NISHIGAKI Y, SAKTHISEKARAN D, SETHI G & NISHIGAKI I (2013). The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*, **9**: 1057-69.
- RASK-MADSEN C & KING GL (2013). Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab*, **17**: 20-33.
- REIL JC, CUSTODIS F, SWEDBERG K, KOMAJDA M, BORER JS, FORD I, TAVAZZI L, LAUFS U & BOHM M (2011). Heart rate reduction in cardiovascular disease and therapy. *Clin Res Cardiol*, **100**: 11-9.
- REIL JC, HOHL M, REIL GH, GRANZIER HL, KRATZ MT, KAZAKOV A, FRIES P, MULLER A, LENSKI M, CUSTODIS F, GRABER S, FROHLIG G, STEENDIJK P, NEUBERGER HR & BOHM M (2013). Heart rate reduction by If-inhibition improves vascular stiffness and left ventricular systolic and diastolic function in a mouse model of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J*, **34**: 2839-49.
- RICCIONI G (2012). Ivabradine: an intelligent drug for the treatment of ischemic heart disease. *Molecules*, **17**: 13592-604.
- RIDDLE MC (2011). Glycemic control and cardiovascular mortality. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, **18**: 104-9.
- RIDKER PM, BROWN NJ, VAUGHAN DE, HARRISON DG & MEHTA JL (2004). Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation*, **109**: IV6-19.
- ROBINSON RB, YU H, CHANG F & COHEN IS (1997). Developmental change in the voltage-dependence of the pacemaker current, if, in rat ventricle cells. *Pflugers Arch*, **433**: 533-5.
- ROUBILLE F & TARDIF JC (2013). New therapeutic targets in cardiology: heart failure and arrhythmia: HCN channels. *Circulation*, **127**: 1986-96.
- SAITOW F & KONISHI S (2000). Excitability increase induced by beta-adrenergic receptor-mediated activation of hyperpolarization-activated cation channels in rat cerebellar basket cells. *J Neurophysiol*, **84**: 2026-34.
- SAN MARTIN A, DU P, DIKALOVA A, LASSEGUE B, ALEMAN M, GONGORA MC, BROWN K, JOSEPH G, HARRISON DG, TAYLOR WR, JO H & GRIENDLING KK (2007). Reactive oxygen species-selective regulation of aortic inflammatory gene expression in Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **292**: H2073-82.

- SANTORO B, CHEN S, LUTHI A, PAVLIDIS P, SHUMYATSKY GP, TIBBS GR & SIEGELBAUM SA (2000). Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci*, **20**: 5264-75.
- SARTIANI L, DE PAOLI P, STILLITANO F, AIMOND F, VASSORT G, MUGELLI A & CERBAI E (2006). Functional remodeling in post-myocardial infarcted rats: focus on beta-adrenoceptor subtypes. *J Mol Cell Cardiol*, **40**: 258-66.
- SAYE JA, SINGER HA & PEACH MJ (1984). Role of endothelium in conversion of angiotensin I to angiotensin II in rabbit aorta. *Hypertension*, **6**: 216-21.
- SCHIRMER SH, DEGEN A, BAUMHAKEL M, CUSTODIS F, SCHUH L, KOHLHAAS M, FRIEDRICH E, BAHLMANN F, KAPPL R, MAACK C, BOHM M & LAUFS U (2012). Heart-rate reduction by If-channel inhibition with ivabradine restores collateral artery growth in hypercholesterolemic atherosclerosis. *Eur Heart J*, **33**: 1223-31.
- SCICCHITANO P, CARBONARA S, RICCI G, MANDURINO C, LOCOROTONDO M, BULZIS G, GESUALDO M, ZITO A, CARBONARA R, DENTAMARO I, RICCIONI G & CICCONE MM (2012). HCN channels and heart rate. *Molecules*, **17**: 4225-35.
- SHARMA V, DHILLON P, WAMBOLT R, PARSONS H, BROWNSEY R, ALLARD MF & MCNEILL JH (2008). Metoprolol improves cardiac function and modulates cardiac metabolism in the streptozotocin-diabetic rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **294**: H1609-20.
- SHI W, WYMORE R, YU H, WU J, WYMORE RT, PAN Z, ROBINSON RB, DIXON JE, MCKINNON D & COHEN IS (1999). Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res*, **85**: e1-6.
- SHIH H (1994). Anatomy of the action potential in the heart. *Texas Heart Institute Journal*, **21**: 30.
- SIMKO F, BAKA T, POGLITSCH M, REPOVA K, AZIRIOVA S, KRAJCIROVICOVA K, ZORAD S, ADAMCOVA M & PAULIS L (2018). Effect of Ivabradine on a Hypertensive Heart and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in L-NAME-Induced Hypertension. *Int J Mol Sci*, **19**.
- SIMON L, GHALEH B, PUYBASSET L, GIUDICELLI JF & BERDEAUX A (1995). Coronary and hemodynamic effects of S 16257, a new bradycardic agent, in resting and exercising conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther*, **275**: 659-66.
- SINGH D, AKINGBOLA A, ROSS-ASCUITTO N & ASCUITTO R (2016). Electrocardiac effects associated with lithium toxicity in children: an illustrative case and review of the pathophysiology. *Cardiol Young*, **26**: 221-9.

- SKALIDIS EI, HAMILOS MI, CHLOUVERAKIS G, ZACHARIS EA & VARDAS PE (2011). Ivabradine improves coronary flow reserve in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*, **215**: 160-5.
- SPERANZA L, FRANCESCHELLI S & RICCIONI G (2012). The biological effects of ivabradine in cardiovascular disease. *Molecules*, **17**: 4924-35.
- STAMLER JS, LAMAS S & FANG FC (2001). Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*, **106**: 675-83.
- STEIN RB, GOSSEN ER & JONES KE (2005). Neuronal variability: noise or part of the signal? *Nat Rev Neurosci*, **6**: 389-97.
- STEINBERG HO, CHAKER H, LEAMING R, JOHNSON A, BRECHTEL G & BARON AD (1996). Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest*, **97**: 2601-10.
- STIEBER J, STOCKL G, HERRMANN S, HASSFURTH B & HOFMANN F (2005). Functional expression of the human HCN3 channel. *J Biol Chem*, **280**: 34635-43.
- STIEBER J, THOMER A, MUCH B, SCHNEIDER A, BIEL M & HOFMANN F (2003). Molecular basis for the different activation kinetics of the pacemaker channels HCN2 and HCN4. *J Biol Chem*, **278**: 33672-80.
- STILLI D, SGOIFO A, MACCHI E, ZANIBONI M, DE IASIO S, CERBAI E, MUGELLI A, LAGRASTA C, OLIVETTI G & MUSSO E (2001). Myocardial remodeling and arrhythmogenesis in moderate cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **280**: H142-50.
- STILLITANO F, LONARDO G, ZICHA S, VARRO A, CERBAI E, MUGELLI A & NATTEL S (2008). Molecular basis of funny current (If) in normal and failing human heart. *J Mol Cell Cardiol*, **45**: 289-99.
- TARDIF JC (2007). Clinical results of I(f) current inhibition by ivabradine. *Drugs*, **67 Suppl 2**: 35-41.
- TARDIF JC (2009). Heart rate as a treatable cardiovascular risk factor. *Br Med Bull*, **90**: 71-84.
- TARDIF JC, FORD I, TENDERA M, BOURASSA MG, FOX K & INVESTIGATORS I (2005). Efficacy of ivabradine, a new selective I(f) inhibitor, compared with atenolol in patients with chronic stable angina. *Eur Heart J*, **26**: 2529-36.
- TARDIF JC, O'MEARA E, KOMAJDA M, BOHM M, BORER JS, FORD I, TAVAZZI L, SWEDBERG K & INVESTIGATORS S (2011). Effects of selective heart rate reduction with ivabradine on left ventricular remodelling and function: results from the SHIFT echocardiography substudy. *Eur Heart J*, **32**: 2507-15.

- TARDIF JC, PONIKOWSKI P, KAHAN T & INVESTIGATORS AS (2009). Efficacy of the I(f) current inhibitor ivabradine in patients with chronic stable angina receiving beta-blocker therapy: a 4-month, randomized, placebo-controlled trial. *Eur Heart J*, **30**: 540-8.
- TESFAMARIAM B & COHEN RA (1992). Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol*, **263**: H321-6.
- TSANTOULAS C, LAINEZ S, WONG S, MEHTA I, VILAR B & MCNAUGHTON PA (2017). Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated 2 (HCN2) ion channels drive pain in mouse models of diabetic neuropathy. *Sci Transl Med*, **9**: eaam6072.
- TU H, ZHANG L, TRAN TP, MUELLEMAN RL & LI YL (2010). Diabetes alters protein expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel subunits in rat nodose ganglion cells. *Neuroscience*, **165**: 39-52.
- URBANEK I, KACZMAREK K, CYGANKIEWICZ I & PTASZYNSKI P (2014). Risk-benefit assessment of ivabradine in the treatment of chronic heart failure. *Drug Healthc Patient Saf*, **6**: 47-54.
- VAILLANT F, DEHINA L, DIZERENS N, BUI-XUAN B, TABIB A, LAUZIER B, CHEVALIER P, DESCOTES J & TIMOUR Q (2013). Ivabradine but not propranolol delays the time to onset of ischaemia-induced ventricular fibrillation by preserving myocardial metabolic energy status. *Resuscitation*, **84**: 384-90.
- VAN BOGAERT PP & PITTOORS F (2003). Use-dependent blockade of cardiac pacemaker current (I<sub>f</sub>) by cilobradine and zatebradine. *Eur J Pharmacol*, **478**: 161-71.
- VILAIN JP (2006). The discovery of the selective I<sub>f</sub> current inhibitor ivabradine (Procoralan): a new therapeutic approach to ischemic heart disease. *Med Sci (Paris)*, **22**: 87-94.
- VOLTERRANI M, CICE G, CAMINITI G, VITALE C, D'ISA S, PERRONE FILARDI P, ACQUISTAPACE F, MARAZZI G, FINI M & ROSANO GM (2011). Effect of Carvedilol, Ivabradine or their combination on exercise capacity in patients with Heart Failure (the CARVIVA HF trial). *Int J Cardiol*, **151**: 218-24.
- WALCHER T, BERNHARDT P, VASIC D, BACH H, DURST R, ROTTBAUER W & WALCHER D (2010). Ivabradine reduces chemokine-induced CD4-positive lymphocyte migration. *Mediators Inflamm*, **2010**: 751313.
- WHEATCROFT SB, WILLIAMS IL, SHAH AM & KEARNEY MT (2003). Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med*, **20**: 255-68.
- WILLIAMS SB, CUSCO JA, RODDY MA, JOHNSTONE MT & CREAGER MA (1996). Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*, **27**: 567-74.

- WOYWODT A, BAHLMANN FH, DE GROOT K, HALLER H & HAUBITZ M (2002). Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant*, **17**: 1728-30.
- XU J & ZOU MH (2009). Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation*, **120**: 1266-86.
- YAVUZ M & ONAT F (2018). The Role of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels in the Pathophysiology of Absence Epilepsy. *Epilepsi: Journal of the Turkish Epilepsi Society*, **24**: 41-50.
- YU H, CHANG F & COHEN IS (1993). Pacemaker current exists in ventricular myocytes. *Circ Res*, **72**: 232-6.
- YU H, CHANG F & COHEN IS (1995). Pacemaker current  $i(f)$  in adult canine cardiac ventricular myocytes. *J Physiol*, **485 ( Pt 2)**: 469-83.
- ZHANG Y, BABCOCK SA, HU N, MARIS JR, WANG H & REN J (2012). Mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) protects against streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy: role of GSK3 $\beta$  and mitochondrial function. *BMC Med*, **10**: 40.
- ZUO G, REN X, QIAN X, YE P, LUO J, GAO X, ZHANG J & CHEN S (2018). Inhibition of JNK and p38 MAPK-mediated inflammation and apoptosis by ivabradine improves cardiac function in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *J Cell Physiol*.
- ZUO GF, REN XM, GE Q, LUO J, YE P, WANG F, WU W, CHAO YL, GU Y, GAO XF, GE Z, GAO HB, HU ZY, ZHANG JJ & CHEN SL (2019). Activation of the PP2A catalytic subunit by ivabradine attenuates the development of diabetic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, **130**: 170-183.

## EKLER

### Ek-1. Etik Kurul Onay Raporu



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

**TOPLANTI TARİHİ** : 24/02/2016  
**TOPLANTI NO** : 2016-5  
**DOSYA NO** : 2016-51  
**KARAR NO** : 2016-5-58

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Arzu Beşikçi, araştırmacı olarak Arş.Gör.Dr.Gülin Amasya, Arş.Gör.Berna Güven ve Ecz.Zümra Kara'nın yaptığı "İvabradinin Kardiyovasküler Pleiotropik Etkilerinin ve Bu Etkilere Aracılık Eden Mekanizmaların Streptozotosin Diyabet Modelinde İncelenmesi " başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sığır  
Hayvan Sayısı : 84  
Geçerlilik Süresi : 01/07/2016-01/01/2019

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

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 / 2064 Faks: 0 (312) 212 60 49

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

## ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

Adı : Zümra  
Soyadı : KARA  
Doğum yeri ve tarihi : ANTALYA,1991  
Uyruğu : T.C.  
Medeni durumu : Bekar  
İletişim adresi ve telefonu : Mehmet Akif Ersoy Mah.295 Sok No:6,  
ANKARA  
+905386556044

### II- Eğitimi

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2009-2014)  
Yabancı dili: İngilizce

### III- Ünvanları

Eczacı

### IV- Mesleki deneyimi

2018-halen Eczacı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi

### V- Üye olduğu bilimsel kuruluşlar

Türk Farmakoloji Derneği

### VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

#### Makaleler

1. Demirel S, Ayhan Kılıcıgil G, Kara Z, **Güven B**, Onay-Besikci A. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Some Benzimidazole Acetohydrazide Derivatives as EGFR Inhibitors, Turk J Pharm Sci, 14 (3), 285-289, 2017.

2. Celik İ, Ayhan-Kılıçgil G, **Güven B**, Kara Z, Gurkan-Alp AS, Karayel A, Onay-Besikci A. Design, synthesis and docking studies of benzimidazole derivatives as potential EGFR inhibitors. Eur J Med Chem, 173:240-249, 2019.

#### Bildiriler

1. **Kara Z**, Güven B., Onay-Besikci A. Investigation of the Pleiotropic Vascular Effects of Ivabradine in Control and Diabetic Rats, 20th Annual Meeting of European Council for Cardiovascular Research, ECCR, October 14-16, 2016, Lake Garda, Poiano, Italy.
2. Çelik İ, Kılıçgil G, **Kara Z**, Güven B, Besikci A. Synthesis of Some 1H-Benzimidazoles Containing Cyclohexyl Substituted Thiosemicarbazides, Triazoles, Thiadiazoles as Inhibitors of EGFR Tyrosine Kinase. GPSS2017, October 11-13, 2017.
3. **Kara Z**, Güven B, Onay-Besikci A. The Mechanism of Acute and Chronic Vascular Effects of Ivabradine in Control and Diabetic Rats. Frontiers in CardioVascular Biology 2018, April 20-22, 2018, Vienna, Austria.
4. Güven B, **Kara Z**, Onay-Besikci A. Therapeutic effect of Carvedilol on Cardiac Function in Streptozotocin-Diabetic Rats. Frontiers in CardioVascular Biology 2018, April 20-22, 2018, Vienna, Austria.
5. Yılmaz D, **Kara Z**, Güven B, Beşikci A, Gür S. The Possible Beneficial Effect of Ivabradine Treatment on Erectile Tissue in a Diabetic Rat Model. ISOPS 12th , June 26-29, 2018, Ankara, Turkey.
6. Yılmaz D, Güven B, **Kara Z**, Gür S, Beşikci A. The Effect of Carvedilol Treatment on Erectile Dysfunction in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. ISOPS 12th June 26-29, 2018, Ankara, Turkey.
7. **Kara Z**, Güven B, Onay-Besikci A. Presence of HCN Channels in Rat Aorta and Prevention of Endothelial Dysfunction with Their Selective Inhibitor Ivabradine. Pharmacology 2018, December 18-20, 2018, London, UK.
8. Güven B, **Kara Z**, Onay-Besikci A. Metabolic Effects of Carvedilol Through  $\beta$ -arrestin-2: Investigations in Cells and Streptozotocin-Diabetic Rats. SHVM 17th Annual Scientific Sessions, June 23-26, 2019, Amsterdam, The Netherlands.

## VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı Burslar: 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı (TÜBİTAK)

Ödüller: European Council For Cardiovascular Research (ECCR)-Genç Araştırmacı Yarışması Birincilik Ödülü, 2016, İtalya

Projeler: 2017-2020 TÜBİTAK, Proje numarası: 116S631 *İvabradinin Kardiyovasküler Pleiotropik Etkilerinin ve Bu Etkilere Aracılık Eden Mekanizmaların Streptozotosin Diyabet Modelinde İncelenmesi*, Bursiyer

## VIII-Diğer Bilgiler

Katıldığı Eğitim Seminerleri:

1. Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası Eğitim Programı
2. İş Sağlığı ve Güvenliği Eğitim Programı
3. Farmakovijilans İrtibat Noktası Eğitim Programı

Bilimsel Toplantılar:

1. Türk Eczacıları Birliği Gençlik Komisyonu 2. Çalıştay (Katılımcı) 2013-Çeşme/TÜRKİYE
2. Farmavizyon (Katılımcı) 2014-İstanbul/ TÜRKİYE
3. İVEK Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi (Katılımcı) 2014-İstanbul/TÜRKİYE
4. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS) (Katılımcı) 2015-Ankara/TÜRKİYE
5. XI. Ankara Biotechnology Days (Katılımcı) 2015-Ankara/TÜRKİYE
6. 23. Ulusal Farmakoloji Kongresi (Katılımcı) 2015-Ankara/TÜRKİYE
7. EUROPEAN COUNCIL FOR CARDIOVASCULAR RESEARCH (ECCR)-2016-İtalya Sözlü Sunum
8. FRONTIERS IN CARDIOVASCULAR BIOLOGY (FCVB)-2018-European Society of Cardiology- Viyana Poster sunumu
9. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS) 2018-Ankara/TÜRKİYE Poster sunumu
10. Pharmacology 2018, December 18-20, 2018, London, UK-Poster sunumu