

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyofizik Anabilim Dalı**

**DİYABETİK SIÇAN VENTRİKÜL
MİYOSİTLERİNİN UYARILMA-KASILMA
ÇİFTLENİMİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERE
SODYUM TUNGSTATE TEDAVİSİNİN ETKİSİ**

Mustafa AYDEMİR

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2011

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyofizik Anabilim Dalı**

**DIYABETİK SIÇAN VENTRİKÜL
MİYOSİTLERİNİN UYARILMA-KASILMA
ÇİFTLENİMİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERE
SODYUM TUNGSTATE TEDAVİSİNİN ETKİSİ**

Mustafa AYDEMİR

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Semir ÖZDEMİR

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından
proje numarası ile desteklenmiştir (Proje No: 2010.02.0122.005).

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir.”

Antalya, 2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyofizik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. .../.../2011

Tez Danışmanı



: Doç. Dr. Semir ÖZDEMİR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim dalı

Üye



: Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim dalı

Üye



: Doç. Dr. Narin DERİN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim dalı

Üye



: Prof. Dr. Mutay ASLAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim dalı

Üye



: Doç. Dr. Nazmi YARAŞ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih, Sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail Üstünel
Enstitü Müdür

ÖZET

Son yıllarda yapılan araştırmalarda perfüze edilen diyabetik sıçan kalplerinde sodyum tungstat'ın kardiyak performansı geliştirdiği belirtilmiştir. Bu çerçevede çalışmamızda sodyum tungstat'ın bu yararlı etkisinin altında yatan hücrel ve moleküler mekanizmalar araştırılmıştır.

Sodyum tungstat 6 hafta boyunca gavajla diyabet ve kontrol grubu sıçanlara günde 100 mg/kg olarak verilmiştir. Bu süre sonunda diyabetik sıçanlarda glikoz düzeyi dramatik biçimde artmıştır. Diğer taraftan plazma insülin düzeyi, vücut ve kalp ağırlığı azalmış, diğer parametrelerde ise dikkate değer bir değişim gözlenmemiştir.

Fura-2 AM yüklenmiş izole ventrikül miyositlerinde sarkomer boyundaki değişim ve hücre içi Ca^{2+} [Ca^{2+}]_i transienleri ölçüldü. Sodyum tungstat tedavisi diyabetik kardiyomiyositlerde azalmış olan Ca^{+2} transienlerinin ve fraksiyonel kısalma eğrilerinin genliğini arttırmıştır. Ayrıca, diyabetle baskılanan Iss ve Ito K akımlarını düzeltmiş, ancak L-tipi Ca^{+2} akımları üzerinde herhangi bir değişiklik yaratmamıştır. Biyokimyasal parametreler açısından diyabetle birlikte kalpte dikkat çekici biçimde artan TBARS ve protein karbonil içeriği sodyum tungstat uygulamasıyla birlikte anlamlı biçimde azalmıştır. Bununla birlikte tungstat tedavisi ksantin oksidaz/ksantin dehidrogenaz aktivitesini belirgin bir şekilde düşürmesine rağmen, gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak, sodyum tungstat uygulaması değişen iyonik akımları ve bozulan Ca^{+2} regülasyonunu iyileştirerek diyabet indüklü kontraktıl abnormaliteleri gidermiştir. Bu veriler, sodyum tungstat'ın bu yararlı etkisini glisemi normalizasyonundan daha ziyade antioksidan etkisi ile gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Tip I diyabet, sodyum tungstat, kontraktılite, hücre içi kalsiyum iyon kanalları, oksidatif stres

ABSTRACT

Recently, sodium tungstate was suggested to improve cardiac performance of diabetic rats in perfused hearts. In this study we investigated the cellular and molecular mechanisms underlying this beneficial effect of sodium tungstate.

Tungstate was administered (100 mg/kg/day) to diabetic and control rats intragastrically via gavage needle for six weeks. Blood glucose levels were found to increase dramatically in diabetic animals. Conversely, body weight, heart weight and plasma insulin levels decreased and tungstate treatment did not reverse any of these parameters. Sarcomere shortening and intracellular Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients of isolated ventricular myocytes were measured in Fura-2 AM loaded cells. Sodium tungstate treatment improved the peak shortening and the amplitude of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients in diabetic cardiomyocytes. However, prolonged time characteristics of neither shortening nor $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients were reversed after treatment. Potassium and L-type Ca^{2+} currents were also recorded in isolated ventricular cells. Significant restoration of suppressed Ito and Iss was achieved by tungstate administration. Nevertheless, L-type calcium currents did not change either in diabetic or tungstate treated diabetic rats. Tissue biochemical parameters including TBARS, protein carbonyl content, xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase were also determined to assess whether the effect of tungstate was relevant to oxidative status of heart. Diabetes revealed a marked increase in TBARS and carbonyl content which were decreased significantly by tungstate. Although tungstate treatment markedly decreased xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase activity, this change was not significant among the different treatment groups.

In conclusion, tungstate treatment improved diabetes-induced contractile abnormalities via restoration of dysregulated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and altered ionic currents. This beneficial effect is due to antioxidant property of sodium tungstate rather than normalization of glycaemia.

Keywords: Type 1 diabetes, sodium tungstate, contractility, intracellular calcium, ion channels, oxidative stress

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılması için gerekli olanakları sağlayan, yüksek eğitimim süresince ilgisini ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Semir ÖZDEMİR'e, çalışmalarımda maddi/manevi katkısı olan değerli çalışma arkadaşım Araş. Gör. Nihal ÖZTÜRK ERBOĞA'ya, ayrıca biyokimyasal parametrelerin gerçekleşmesinde yardımcı olan sayın Prof. Dr. Mutay ASLAN ve Araş. Gör. Serdar Doğan'a , teknik olanakları ile bu çalışmanın belirli basamaklarının gerçekleşmesini sağlayan Deney Hayvanları Unitesi çalışanlarına çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kalp Kasının Yapısı	3
2.1.1. Aksiyon Potansiyeli	3
2.1.2. Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi	5
2.2. Diyabet Hastalığı ve Özellikleri	6
2.2.1. Diyabetik Patolojiler: Kardiyomiyopati	7
2.3. Sodyum Tungstat ile Diyabetin ilişkisi	8
2.4. Oksidatif Stres	8
2.4.1 Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Mekanizmaları	9
2.4.2 Serbest radikallerin etkileri	13
2.4.3. Ksantin Oksiredüktaz Sistemi	15
2.4.4. Antioksidan Savunma Sistemi	16
MATERYAL METOD	21
3.1. Deney Grupları ve Diyabetin Oluşturulması	21
3.2. Deney Protokolü	21
3.3. Kardiyak Miyositlerin İzolasyonu	21
3.4. Potasyum Akımlarının Kaydedilmesi	22
3.5. L-tipi Ca^{2+} Akımlarının Kaydedilmesi	22
3.6. Hücre İçi Serbest Ca^{2+} Derişimi Ölçümü	23
3.7. Biyokimyasal Parametreler	23
3.7.1. Ksantin Oksidaz Miktarı Ölçümü	23
3.7.2. Myositlerde Süperoksit Anyon Salınımının Belirlenmesi	23
3.7.3. Protein Karbonil Gruplarının Ölçümü	23
3.7.4. GSH Miktarının Ölçümü	24
3.7.5. Doku Tiobarbütirik Asit Reaktif Ürünlerinin (TBARS) Ölçümleri	24
3.8. Kullanılan Kimyasallar	25
3.9. İstatistiksel Analizler	25

BULGULAR	26
4.1. Hayvanların Genel Durumları	26
4.2. Kasılma ve Hücre içi Ca^{2+} ile İlgili Parametreler	27
4.2.1. Sarkomer boyu	27
4.2.2. Hücre içi Ca^{2+} transientleri	27
4.3. Potasyum ve Kalsiyum Akımları ile İlgili Bulgular	29
4.3.1. Diyabetin ve Sodyum Tungstat Uygulamasının K^+ Akımları Üzerine Etkileri	29
4.3.2. L-tipi Ca^{2+} Akımları	30
4.4. Biyokimyasal Parametreler	31
4.4.1. TBARS ve Protein Karbonil İçeriği	31
4.4.2. XO ve XDH Aktivitesi	31
4.4.3. Süperoksit Anyonu Salınımı Sonuçları	32
4.4.4. Glutasyon (GSH)	32
TARTIŞMA	34
SONUÇLAR	38
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	50

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AP	: Aksiyon potansiyeli
I_{to}	: Geçici dışarı doğru potasyum akımı
I_{ss}	: Kararlı potasyum akımı
I_{CaL}	: L-tipi Ca ²⁺ akımı
SERCA	: Sarko/endoplazmik retikulum Ca ²⁺ -ATPaz
NCX	: Na ⁺ /Ca ²⁺ değiştokuşçusu
SR	: Sarkoplazmik retikulum
[Ca²⁺]_i	: Hücre içi serbest Ca ²⁺ derişimi
PLB	: Fosfolamban
CICR	: Ca ²⁺ uyarımlı Ca ²⁺ salımı
DM	: Diabetes mellitus
IDDM	: İnsüline bağlı diabetes mellitus
NIDDM	: İnsüline bağlı olmayan diabetes mellitus
STZ	: Streptozotocin
TP	: Tepe değerine ulaşma süresi.
RT₇₅	: Relaksasyonun % 75'sine ulaşması için geçen süre.
τ_{decay}	: Maksimum değerin % 37'sine iniş süresi.
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
XO	: Ksantin oksidaz
XDH	: Ksantin dehidrogenaz
GSH	: Glutasyon
CAT	: Katalaz
TBARS	: Tiyobarbütirik Asit Reaktif Ürünleri
R_{YR}	: Riyanodin reseptörü
SOD	: Süperoksid dismutaz
LVP	: Sol ventrikül basıncı
NO	: Nitrik oksit
CdCl₂	: Kadmiyum klorür
GSH-P_x	: Glutasyon peroksidaz
TBA	: Tiyobarbitürik asit
FAD	: Flavın adenin dinükleotid
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
Na₂WO₄	: Sodyum tungtat
NADPH	: β-Nikotin Amid Dinükleotid Hidrojen Fosfat
O₂•⁻	: Süperoksid anyonu
GSSGR	: Glutasyon reduktaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Ventrikül aksiyon potansiyelinin evreleri ve onlara karşılık gelen iyon akımları.	4
2.2. Ventrikül hücrelerinde hücre içi Ca^{2+} düzenlenmesi	5
2.3. ROS	11
2.4. XO'nun pürin metabolizmasında görevi	16
2.5. Antioksidan Enzim Sistemleri	17
2.6. Süperoksit dismutazın yapısı	18
4.1. Gruplardan izole edilen Fura 2AM yüklü kardiyomiyositlerin 0.5 Hz frekanslı alan uyarısıyla kaydedilen kasılma yanıtları ve $[Ca^{2+}]_i$ tranziientleri	28
4.2. Gruplara ait örnek potasyum akımları ve akım yoğunluğu-zar potansiyeli değişim eğrileri	29
4.3. Gruplara ait ventrikül hücrelerinden kaydedilen ortalama I_{CaL} akım yoğunluklarının potansiyel değerlerine göre değişimi ve örnek akım kayıtları	30
4.4. Kalp dokusunda ölçülen gruplara ait TBARS değerleri ve protein karbonil düzeyi	31
4.5. Kalp dokusunda ölçülen gruplara ait ksantin oksidaz ve ksantin dehidrogenaz enzim aktiviteleri	32
4.6. İzole edilen kardiyomiyositlerden ölçülen süperoksit anyon salınımı miktarı	33
4.7. Gruplara ait kalp dokusu örneklerinden GSH miktarları	33

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
2.1.	Reaktif oksijen türlerinin simgeleri ve elektron yapıları	10
4.1.	Hayvanların genel parametreleri.	26

GİRİŞ

Diyabet (diabetes mellitus) karbonhidrat, yağ, elektrolit ve protein metabolizmasındaki bozukluklar sonucunda oluşan ve uzun vadede hem akut hem de kronik komplikasyonlara yol açan metabolik bir hastalıktır (1-3). Diyabet insülin yetmezliği, insülin etkinliğinin bozulması ya da her ikisinin sonucu olarak açlık kan glikozunun yükselmesi ve glikoz toleransının bozulması ile kendini göstermektedir (4).

Diyabetin görülme sıklığı her geçen gün artmaktadır. Tahminlere göre dünya çapında, 1995 yılında 135 milyon olan diyabetli sayısının 2025 yılında 300 milyona ulaşması beklenmektedir (5). Diyabet hastalığına sahip bu bireylerdeki ölümlerin 3/4'ünün kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklanacağı tahmin edilmektedir (6). Bu bilgiler ışığında diyabetin hem günümüzde hem de önümüzdeki yıllarda önemli bir sağlık problemi olacağı rahatlıkla söylenebilir.

Diyabet hastalığına sahip bireylerdeki en önemli ölüm sebeplerinden biri diyabetik kardiyomiyopatidir. Diyabetik kardiyomiyopatinin patogenezi multifaktoriyeldir. Latent bir evre ile karakterize olan diyabetik kardiyomiyopatide, bu evre boyunca miyokardiyum hücrel, yapısal ve fonksiyonel değişiklikler ile hasar görülür. Bu durum neticesinde öncelikle diyastolik disfonksiyon, daha sonra ilerleyerek sol ventrikül hipertrofisi ve son olarak da sistolik disfonksiyon gerçekleşir (6). Ayrıca diyabetik sıçan modeli kullanılan deneylerde papiller kasın kısalma ve gevşeme kinetiklerinin yavaşladığı ve sol ventrikül içi basınç parametrelerinin bozulduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (7-12).

Kardiyak elektromekanik olayların ve enerji metabolizmasının önemli bir belirleyicisi, aynı zamanda kalp kasılmasının da majör düzenleyicisi olan intrasellüler kalsiyumdaki anormallikler diyabetik kardiyomiyopatide karakteristiktir (5, 13, 14, 15). Diyabetik kalplerde kalsiyum taşınımı sağlayan L-tipi Ca^{2+} kanalları, Na-Ca değiş-tokuşçusu (NCX), Ca-ATPaz, ryanodin reseptörleri (RyRs) ve Ca bağlayıcı proteinler gibi taşıyıcıların ekspresyonundaki ve/veya fosforilasyonundaki anormalliklere bağlı olarak Ca^{2+} homeostazisinde bozukluk meydana geldiği iddia edilmektedir (7, 15, 16). Nitekim deneysel sıçan modelleriyle yapılan çalışmalarda diyabetik kalpte NCX, sarkoplazmik retikulum Ca-ATPaz (SERCA), RyR gibi hücre içi Ca^{2+} düzenleyici proteinlerin seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir (17-20). Bu değişiklikler neticesinde bozulan Ca^{2+} transportu uyarılma-kasılma çiftleniminde anormalliklere ve kardiyomiyosit kaybına neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak diyabetik kardiyomiyositlerde Ca^{2+} transientlerinin genliklerinin azaldığı, kinetik parametrelerinin ise uzadığı bildirilmiştir (8, 9, 11, 17, 21-24). Bu anormallikler sonucu izole edilen diyabetik kalplerde sağlıklı kalplere göre bozulmuş kontraksiyon, azalmış hücre kısalması ve düşük relaksasyon hızı gözlenmiştir (15, 25, 26). Kardiyak hipertrofi, fibrosis, kontraktıl disfonksiyon gibi çeşitli kalp bozukluklarının etiyolojisinde yer alan reaktif oksijen türleri (ROS)'nin, diyabetik kalplerde de üretiminin arttığı hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (6).

Kardiyomiyositlerde hasara neden olan Ca^{2+} 'nın hücre içinde artmasına (overload) sebep olan mekanizmalardan biri olduğu düşünülen ROS, bu etkisini Ca^{2+} kullanan (handling) proteinleri doğrudan etkileyerek, ya da dolaylı olarak membran lipid peroksidasyonu ile gerçekleştirebilir (27-30). SERCA gibi bazı hücresel proteinler Ca^{2+} aktive eden proteazlar (calpains) için substrat olabileceğinden proteolitik degradasyon Ca^{2+} 'nın yüklenmesine (overload) katkıda bulunabilir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz gibi endojen antioksidan proteinler Ca^{2+} aktive eden proteazlar için hedef olabilir. Oksidatif stres ile Ca^{2+} yüklenmesi (overload) arasında ilişki olduğunu teyit etmek için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır (27, 31). Ayrıca, Streptozotocin (STZ) indüklü-diyabetik sıçanlarda kardiyak fonksiyonun azalmasıyla birlikte SOD ve glutatyon peroksidazın myokardiyal aktivitelerinde azalma olduğu gösterilmiş, böylelikle kalp yetmezliğinin oksidatif stres artışına bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Buna ek olarak, diyabetik hayvanların antioksidan özelliklere sahip ajanlarla tedavi edilmesinin kardiyak performansı geliştirerek oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (27, 32-35).

Son yıllarda diyabette bozulan insülin metabolizmasına etki eden pek çok inorganik element tanımlanmıştır (4). Bu inorganik elementler içinde vanadyum (36), krom (37), molibdenyum(38), kobalt (39) ve çinko (40) sayılabilir. Öte yandan bazı çalışmalarda sodyum tungstat (Na_2WO_4)'ın da diyabetik hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda anti-diyabetik etkiler gösterdiği ortaya konulmuştur (41-43). Birçok bakımdan vanadyuma benzeyen sodyum tungstat yapılan araştırmalarda STZ-diyabetik sıçanlarda plazma glikoz, trigliserit ve serbest yağ asidi düzeyini düşürmüştür. Sodyum tungstat'ın bu etkileri insülin düzeyi artışından daha ziyade insülin aktivitesini arttırarak sağladığı iddia edilmektedir (44). Sodyum tungstat, diyabet sebebiyle karaciğer glikoz metabolizmasında gelişen olumsuz etkileri (fruktoz 2,6 bifosfat, glukokinaz, glikojen fosforilaz alfa, pruvat kinaz, glikoz-6-fosfat, glikojen sentaz) önemli ölçüde iyileştirmiştir (41-43). Bunun yanında sodyum tungstat, vanadyumdan farklı olarak dehidratasyon, diyare ve serum üre artışı gibi olumsuz etkilere sahip değildir (46-48). Ayrıca efektif bir ksantin oksidaz (XO) inhibitörü olan sodyum tungstat'ın antioksidan özelliği ile STZ' nin pankreatik beta hücrelerindeki toksik etkisini azaltabileceği düşünülmektedir (44). Deneysel çalışmalarda ksantin ve XO ile perfüze edilen diyabetik sıçan kalplerinin kasılma kuvvetinde azalma meydana geldiği ve bununla vanadyum uygulamasıyla giderilebileceği gösterilmiştir (45).

Nagareddy ve ark.'nın (44) Wistar cinsi erkek sıçana 9 haftalık periyot boyunca sodyum tungstat vererek yaptığı çalışmada, sodyum tungstat'ın STZ-Diyabetik sıçanlarda sol ventrikül basıncını (LVP), kasılma hızını (+dP/dT) ve gevşeme hızını (-dP/dT) iyileştirerek kalp fonksiyonunda olumlu etkiler yarattığı ve bunun sonucunda kardiyomiyopatiyi engellediği belirtilmiştir. Sodyum tungstat'ın diyabetik kalpte yarattığı bu olumlu etkinin XO inhibitörü olması nedeniyle antioksidan özelliğinden kaynaklanabileceği iddia edilmiştir (44). Ancak, kalbin fonksiyonlarındaki bu düzelmenin hangi iyonik mekanizmalarla gerçekleştiği ve oksidatif stresle ilişkisi deneysel olarak gösterilmemiştir. Dolayısıyla bu çalışmanın amacı, uzun süreli sodyum tungstat tedavisinin diyabetik kalpte değişen kasılma parametrelerine ve iyonik mekanizmalara etkisini ortaya koymak ve bu etkinin oksidatif stres ile olan ilişkisini aydınlatmaktır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Kalp Kasının Yapısı

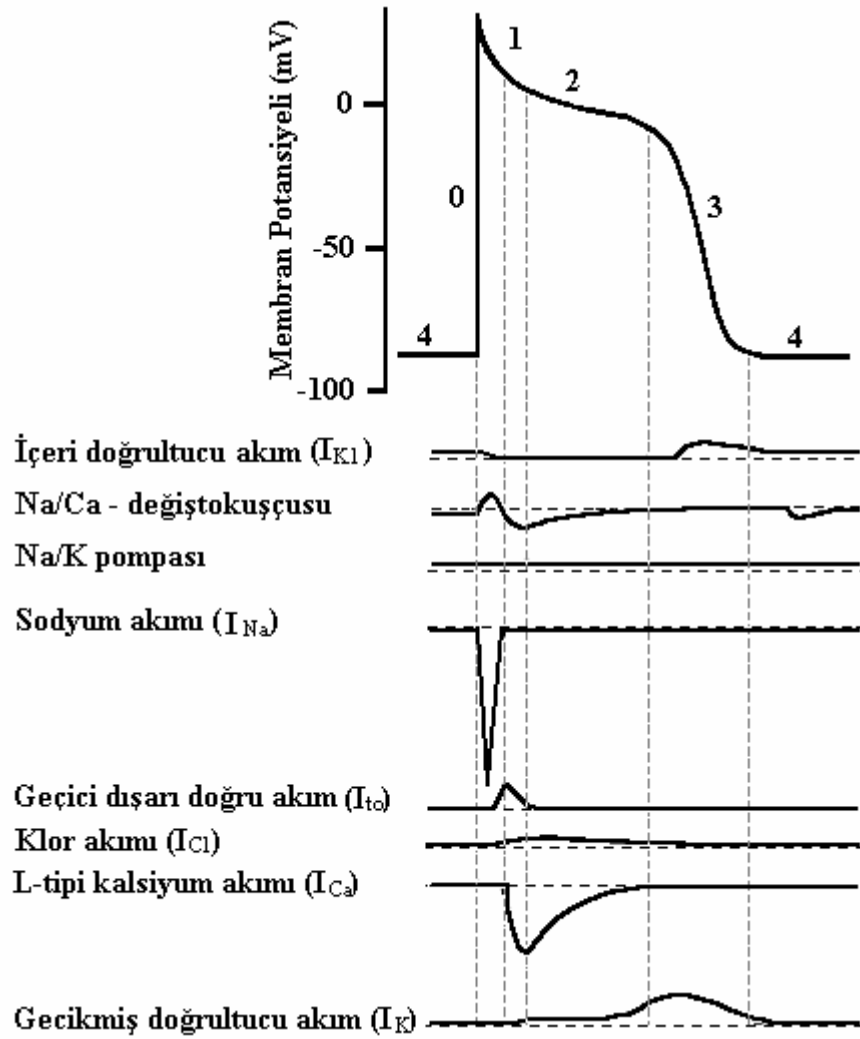
Vücudun tüm doku ve organlarına kan pompalayan kalp, göğüs boşluğunda yer alan fibröz bir kılıf olan perikardiyum ile sarmalanmış, kas yapısında bir organdır. Miyokardiyum da denilen kalbin duvarları temel olarak kardiyak-kas hücrelerinden oluşur. Miyokardiyumun kalp-kası hücreleri birbirine sıkıca bağlanmış tabakalar halinde düzenlenmiş olup, kanın bulunduğu odacıkları bütünüyle sarar. Bir odacığın duvarları kasıldığında sıkılmış bir yumruk gibi bir araya gelir ve çevreledikleri kana basınç uygularlar. Komşu hücreler interkale diskler denen yapılar aracılığı ile uc uca eklenirler. Bunların içinde hücreleri bir arada tutan ve miyofibrillerin de bağlandığı desmozomlar vardır (49). Kalpte uyarı bir noktadan başlayarak iletim sistemi aracılığı ile tüm kalbe yayılır. Uyarının iletimi gap junction denilen hücreler arası bağlantılar yoluyla gerçekleşir.

1.1.1. Aksiyon Potansiyeli

Kalp kasının kasılması diğer kaslarda da olduğu gibi kası oluşturan hücrelerin zarlarının depolarizasyonu ile tetiklenir. Hücrelerin birbiriyle bağlantılı (gap junction) olmalarından dolayı oluşan aksiyon potansiyeli (AP) bir hücreden diğerine geçer. Böylece, başlangıçta bir hücrenin uyarılması diğer bütün hücrelerin uyarılmasıyla sonuçlanır (50). Aksiyon potansiyeli oluşmasının altında zar geçirgenliklerindeki değişiklikler yatmaktadır. Dinlenim durumunda hücre zarı potasyum iyonlarına daha geçirgen olduğu için dinlenim zar potansiyeli potasyum denge potansiyeline yakın bir değerdedir (50).

Kalp AP'nin konfigürasyonu çeşitli fazlara bölünebilir. Şekil 2.1'de ventrikül hücresi AP'nin 5 fazı ve temel olarak her fazdan sorumlu olan akımlar görülmektedir. Faz 0 AP'nin sıçraması; faz 1 erken repolarizasyon evresi; faz 2 plato evresi; faz 3 asıl repolarizasyon fazı; ve faz 4 dinlenim potansiyeli evresidir.

- i) **Faz 0:** AP'nin Na^+ akımlarına bağlı olan hızlı sıçrama evresidir. Bu akımın hızlı aktivasyon ve inaktivasyon kinetikleri vardır. 1 ms'de tepe değerine ulaştıktan sonra kendiliğinden azalır (inaktivasyon). Ufak bir depolarizasyonla Na^+ kanalları açılmaya başladığında, elektrokimyasal gradyentten dolayı Na^+ hücre içine girmeye başlar. Bu durum hücrenin daha fazla depolarize olmasına ve depolarize oldukça da yeni Na^+ kanallarının açılmasına neden olur.
- ii) **Faz 1:** AP'nin çıkışını hemen takip eden geçici ve bağıl olarak küçük repolarizasyon evresidir. Büyük oranda depolarizasyonla hızla açılan bir tip K^+ kanalının geçici dışarı doğru (transient outward (I_{to})) akımına bağlıdır. Daha az olmakla birlikte klor (Cl^-) akımının da katkısı vardır.
- iii) **Faz 2:** Plato evresi olarak bilinen bu faz erken repolarizasyon fazını takip eden ve zar potansiyelinin görece sabit olduğu süreci kapsar.



şekil 2. 1. Ventrikül aksiyon potansiyelinin evreleri ve onlara karşılık gelen iyon akımları. (51).

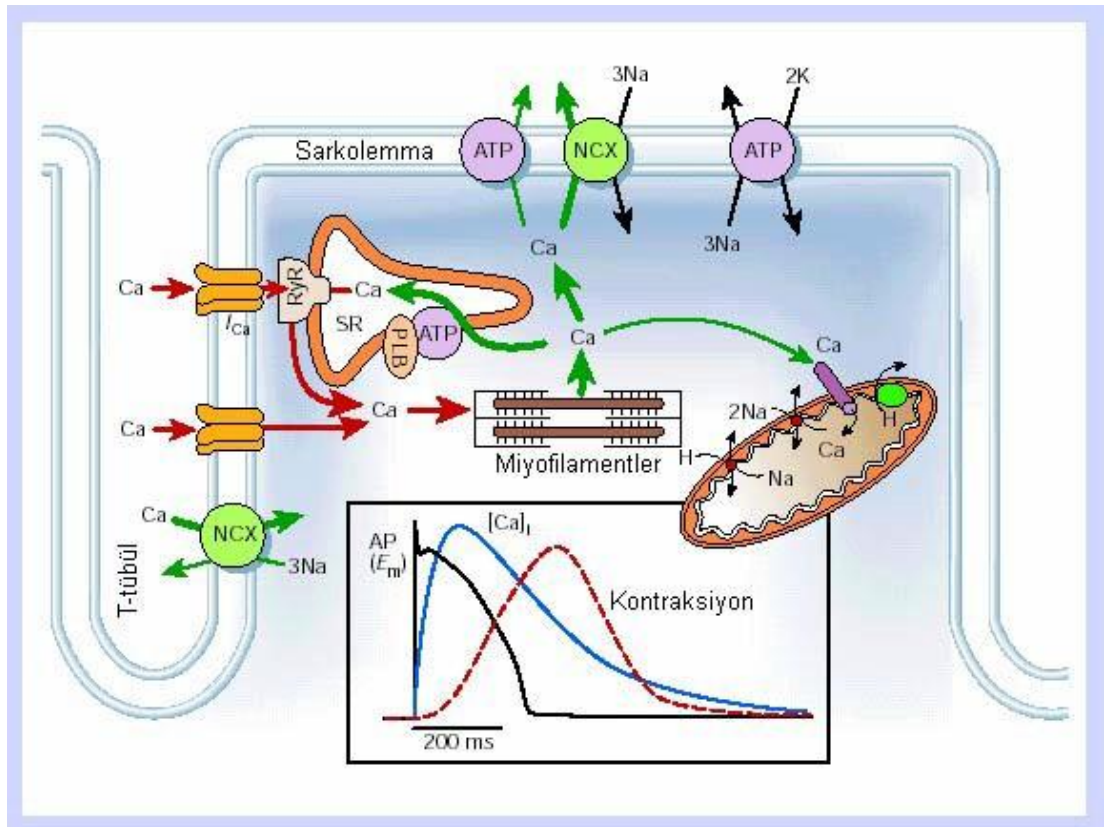
Kalp hücrelerinde görülen uzun AP'nin nedenidir. Platonun nedeni içeri doğru pozitif akımların dışarı doğru pozitif akımları neredeyse dengelemesidir. L-tipi Ca^{2+} kanallarından içeri doğru Ca^{2+} girişine karşılık, yavaş aktive olan K^+ (gecikmiş doğrultucu akım (I_K)) kanallarından K^+ dışarı çıkar. Buna ek olarak, I_{to} 'da platonun erken evresine katkıda bulunmaktadır.

- iv) **Faz 3:** Platoyu takip eden son repolarizasyon evresidir. İnaktivasyon nedeniyle I_{Ca} zamanla azılırken, yavaş aktive olan I_K artar ve baskın hale gelir. Bu akımın inaktivasyonu olmadığından uzun sürelidir.
- v) **Faz 4:** Ventrikül hücrelerinde 4. faz dinlenim potansiyelidir. Zar K^+ iyonlarına yüksek geçirgenlik gösterdiğinden potasyum denge potansiyeline yakın bir değer almaktadır. Dinlenim potansiyeli büyük oranda içeri doğrultucu (I_{K1}) da denenen bir tip K^+ akımı tarafından belirlenmektedir.

Ayrıca, AP'ye katkıda bulunan pompalar da bulunmaktadır: Küçük bir akım oluşturmakla birlikte Na^+/K^+ pompasının asıl işlevi akım üretmekten çok AP'yi oluşturacak iyonik gradyentleri korumaktır (50). Bununla birlikte, NCX normal modunda dışarı attığı her Ca^{2+} için içeri 3 Na^+ taşırken, plato evresinin başlangıcında ters yönde çalışarak önemli bir akım oluşturmaktadır. Bu yüzden, NCX'in AP'nin şekline de etkisi olduğu ileri sürülmüştür (52).

2.1.2. Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi

Uyarılma kasılma çiftlenimi kasılma kuvvetini oluşturan ve kalbin işlevini yerine getirmesini sağlayan organize sinyal işleme yollarının bütünüdür. Bu etkinlik, kardiyak hücre membranının depolarizasyonu sonucu açılan L-tipi Ca^{2+} kanallarının aracılığıyla hücre içine Ca^{2+} girişi ile başlar (Şekil 1.2). Küçük miktardaki bu Ca^{2+} akışı sarkoplazmik retikulum (SR) yüzeyindeki ryanodin reseptörlerinden (RyR) çok daha büyük bir Ca^{2+} salımına yol açar. Sarkoplazmik retikulum aktivasyonunun ve Ca^{2+} salımının ardından, depolarizasyondan sonraki 20-40 ms'lik süreçte sitozolik serbest Ca^{2+} konsantrasyonunda ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 100 nM olan diastolik seviyeden, 1 μM 'lık sistolik seviyeye ani bir artış gerçekleşir (53). Genellikle, SR'dan Ca^{2+} salımının temel mekanizması kabul edilen bu olaya “ Ca^{2+} -uyarımlı Ca^{2+} -salımı” (CICR) denir (53-54).



Şekil 2.2. Ventrikül hücrelerinde hücre içi Ca düzenlenmesi. Alt grafik aksiyon potansiyeli, Ca tranziyeti ve kasılmanın zamansal değişimlerini göstermektedir. NCX, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değiş tokuşcusu; ATP, ATPaz; PLB, fosfolamban; SR, sarkoplazmik retikulum (54).

Kasılma işi, Ca^{2+} 'un troponin C miyofilamentine bağlanıp kontraktıl makineyi harekete geçirmesiyle başlar. TroponinC- Ca^{2+} kompleksi tropomiyozin ile etkileşerek aktin ve miyozin miyofilamentleri arasındaki aktif bölgelerin açığa çıkmasını ve çapraz köprülerin oluşmasını sağlar. Böylece, sarkomer boyu kısalır ve kasılma gerçekleşir (53-54). Ca^{2+} 'un SR Ca^{2+} –pompa (SERCA) ile SR içine geri alınması ve NCX ile hücre dışına atılmasıyla $[Ca^{2+}]_i$ dinlenme seviyesine düşer (50, 53, 54). Bu sırada Ca^{2+} troponin C'den ayrılır ve kas başlangıçtaki gevşeme durumuna geri döner (53, 54).

2.2. Diyabet Hastalığı ve Özellikleri

Diyabet (Diabetes Mellitus) karbonhidrat, yağ, elektrolit ve protein metabolizmasındaki bozukluklar neticesinde, uzun vadede çeşitli akut ve kronik komplikasyonlara yol açan metabolik bir hastalıktır (55, 56). Diyabet insülin yetmezliği, insülin etkinliğinin bozulması veya her ikisinin de sonucu olarak açlık kan glikozunun yükselmesi ve glikoz toleransının bozulması ile kendini gösterir. Etiyolojisi, tarihçesi ve klinik dışavurumları temel alınarak iki ana grupta sınıflandırılmıştır; tip 1 diyabet (insüline- bağılı diyabet (IDDM)) ve tip 2 diyabet (insüline-bağılı olmayan diyabet (NIDDM)) (53)

Tip 1 diyabet her yaşta olmakla birlikte daha çok çocuklarda ve genç yetişkinlerde görülmektedir. Hastalığın kesin nedeni tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, pankreatik beta (β) hücrelerinin otoimmün dejenerasyonu ve/veya çevresel faktörlerin sonucu olduğu düşünülmektedir. Tip 1 diyabetin nedeni hakkındaki en yaygın kanı Langerhans adacıklarındaki pankreatik (β) hücrelerinin otoimmün yoldan tahribatı ile oluştuğu yönündedir (53).

Tip 1 diyabet'in karakteristik özelliği, dolaşımdaki plazma insülin seviyesinin düşmesiyle sonuçlanan insülin üretiminin kaybolmasıdır (53). Bu insülin yetmezliği katekolaminler, kortizol, glukagon ve büyüme hormonları gibi katabolik elemanların varlığında yağ dokusundaki lipolizi (yağ yıkımı) arttırmaktadır (53). Bunun sonucunda dolaşıma yağ asitleri salınmakta, bunlar da karaciğerde keton yapıları, asetoasetik aside ve 3-hidroksibutirik aside dönüşmek üzere okside olmaktadır. Bütün bunlar asidozis denilen duruma katkıda bulunmaktadır. Ketoasidozis'in tedavi edilmediğinde diyabetik koma ve ölümle sonuçlanabilecek semptomları arasında polidipsi, poliüri, kilo kaybı, ayak krampları ve zayıflık bulunmaktadır (57). Bunun yanında birçok organ ve dokuda ölümcül hasarlara da neden olmaktadır.

Diyabetin en yaygın olanı tip 2 diyabetir. Bu form poligenik olmakla ve genlerden etkilenmekle birlikte çevre de önemli bir faktördür. Hastalığın karakteristik özellikleri insülin direnci ve bağılı insülin yetmezliğidir (53). Ancak bu hastalarda insülin seviyeleri genellikle normaldir. Tip 2 diyabette ortaya çıkan sorunların kaynağı pankreas olmayıp, hücre düzeyinde insülin reseptöründeki ve reseptör sonrası basamaklardaki dirençtir (58).

Diyabeti anlamak ve tedavisine yönelik yeni yaklaşımlar geliştirmek amacıyla çoğunlukla hayvanlarda deneysel diyabet modelleri oluşturulmaktadır. Bununla birlikte, çok daha yaygın olmasına rağmen, karmaşık etiyolojisi ve

yeterince anlaşılamamış olmasından dolayı diyabetin tip 2 hayvan modellerinde çok daha az çalışma yapılabilmektedir. Bu hastalığa yönelik geliştirilen birçok genetik ve kimyasal model deneylerinde problemler ortaya çıkmakta ve diyabetten bağımsız komplikasyonlar gelişmektedir. Buna karşılık tip 1 diyabetin deneysel modelleri kimyasal maddelerle kolaylıkla yapılabilmektedir (53, 59, 60). Bu modellerde, deney hayvanına verilen kimyasal pankreasın β -hücrelerinin ölümüne yol açmaktadır. Bu amaçla kullanılan diyabetojenik iki kimyasal ajan alloxan ve STZ'dir. STZ (2-deoxy-2-[[[(methylnitrosamino) carbonyl]amino]-D-lucopyranose]) β -hücrelerine yüksek seçicilik gösterirken, alloxan'ın özgül olmayan nekrotik etkileri olduğu ifade edilmiştir (53, 60).

2.2.1. Diyabetik Patolojiler: Kardiyomiyopati

Kardiovasküler komplikasyonlar diyabetik hastalardaki marazi ve ölümcül vakaların en önemli nedenidir. Diyabetik koşullarda aterosklerotik vasküler hastalıklar sıkça görülmesine rağmen, bunlardan bağımsız olarak kalpte gelişen ve çeşitli fonksiyon bozukluklarına yol açan bir tip kardiyomiyopatinin olduğu da bilinmektedir (61, 62). Diyabetik kardiyomiyopati erken diastolik ve geç sistolik fonksiyon bozukluklarına neden olan bir hastalıktır. Diyabetin yol açtığı bu yetmezliklerin altında yatan etkenler; lif kısalma ve gevşeme hızındaki azalma, düşük miyozin ATPaz aktivitesi, miyozin izoformlarında V_1 (hızlı)'den V_3 (yavaş)'e kayma, sarkoplazmik retikulumun kalsiyum alımında bozulma, insüline duyarlı glikoz taşıyıcısında (GLUT4) azalma vb. hücresel fonksiyon bozukluklarıdır (56, 63).

İnsülin yetmezliği olan diyabetik sıçanlarla yapılan deneylerde papiller kasın kısalma ve gevşeme kinetiklerinin yavaşladığı, gerilme kuvvetinin ise azaldığı gösterilmiştir (64). Trost ve ark. (11) tip 1 diyabetin etkisiyle fare papiller kasında kasılma ve gevşeme sürelerinin uzadığını, buna karşılık gerilme kuvvetinin azaldığını ifade etmişlerdir. Bunun yanında, deneysel diyabet modeli oluşturulan sıçanlarda sol ventrikül papiller kasında kasılma ve gevşeme evrelerinin yavaşlayıp uzadığını, ancak gerilme kuvvetinin değişmediğini gösteren bulgular da ortaya konmuştur (8, 10).

Diyabetik kalplerden kaydedilen aksiyon potansiyellerinin kontrollere göre önemli ölçüde uzamış olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (65, 66, 67). Bu uzamanın iyonik akımlarla ilişkisi araştırılmış ve Ca^{2+} akımlarının değişmediği (68), geçici dışarı doğru (transient outward; I_{to}) ve kararlı-durumdaki (steady-state; I_{ss}) pasif K^+ akımlarının ise azaldığı bildirilmiştir (65, 67). Bununla birlikte, içeri doğrultucu (Inward rectifier; I_{K1}) K^+ akımının diyabetli kalp hücrelerinde değişmediği, fakat gecikmiş doğrultucu (delayed rectifier; I_K) akımının azaldığı ve bunun AP'nin geç repolarizasyon fazındaki uzamaya katkısı olduğu ileri sürülmüştür (67).

Hücre içi Ca^{2+} seviyesi kalbin kasılma sürecindeki en önemli ve belirleyici değişkenlerdendir. Bu yüzden, birçok çalışmada diyabetli kalpte gözlenen kasılma bozukluklarının hücre içi Ca^{2+} homeostazındaki değişikliklerle ilişkili olduğu ortaya konulmuş (8, 11, 21), ancak bu konuda bir uzlaşmaya varılamamıştır. Literatürde diyabetik kardiyomiyositlerde hücre içi Ca^{2+} 'un bazal seviyesinin

arttığına (21), değişmediğine (14), ya da azaldığına (24) ilişkin bulgulara rastlanmaktadır. Bunun yanında, elektriksel uyaranlarla kaydedilen Ca^{2+} transienlerinin genliklerinin azaldığı, kinetik parametrelerinin ise uzadığı bildirilmiştir (17, 23, 24).

Diyabetik kalpte gözlenen fonksiyon bozukluklarının hücre içi serbest Ca^{2+} değişimlerini düzenleyen elemanlardaki ve/veya miyofibrillerin fosforilasyonundaki anormalliklere bağlı olduğu düşünülmektedir (7, 16). Deneysel sıçan modelleriyle yapılan çalışmalarda diyabetik kalpte NCX, SERCA, RYR, fosfolamban (PLB) gibi hücre içi serbest Ca^{2+} düzenleyici proteinlerin seviyelerinin azaldığı gözlenmiştir (17, 18, 19, 20). Bunun yanında, NCX ve SERCA'nın aktivitelerinde de bir azalma olduğu bildirilmiştir (14, 16, 17). Ayrıca, birçok çalışmada diyabetik kalpte arttığı gösterilmiş olan protein kinaz C (PKC)'nin (69, 70) troponin I fosforilasyonu yoluyla aktomiyozin ATPaz aktivitesini ve aktin-miyozin etkileşimini düşürdüğü ileri sürülmektedir (16, 72). Bunun yanında, Shimoni (71) PKC aktivasyonunun normal ventrikül hücrelerinde K^+ akımlarını baskıladığını, buna karşılık PKC inhibitörü ile inkübe edilen diyabetli hücrelerde akımların düzeldiğini göstermiştir.

2.3. Sodyum Tungstat ile Diyabetin ilişkisi

Son yıllarda diyabette bozulan insülin metabolizmasına etki eden pek çok inorganik element tanımlanmıştır (4). Bu inorganik elementler içinde vanadyum (36), krom (37), molibdenyum (38), kobalt (39) ve çinko (40) sayılabilir. Öte yandan bazı çalışmalarda sodyum tungstat (Na_2WO_4)'ın da diyabetik hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda anti-diyabetik etkiler gösterdiği ortaya konulmuştur (41-43). Birçok bakımdan vanadyuma benzeyen sodyum tungstat ile yapılan araştırmalarda STZ-diyabetik sıçanlarda plazma glikoz, trigliserit ve serbest yağ asidi düzeyini düşürmüştür. Sodyum tungstat'ın bu etkileri insülin düzeyi artışından daha ziyade insülin aktivitesini arttırarak sağladığı iddia edilmektedir (44). Sodyum tungstat, diyabet sebebiyle karaciğer glikoz metabolizmasında gelişen olumsuz etkileri (fruktoz 2,6 bifosfat, glukokinaz, glikojen fosforilaz alfa, pruvat kinaz, glikoz-6-fosfat, glikojen sentaz) önemli ölçüde iyileştirmiştir (41-43). Bunun yanında sodyum tungstat, vanadyumdan farklı olarak dehidratasyon, diyare ve serum üre artışı gibi olumsuz etkilere sahip değildir (46-48). Ayrıca efektif bir ksantin oksidaz (XO) inhibitörü olan sodyum tungstat'ın antioksidan özelliği ile STZ' nin pankreatik beta hücrelerindeki toksik etkisini azaltabileceği düşünülmektedir (44). Deneysel çalışmalarda ksantin ve XO ile perfüze edilen diyabetik sıçan kalplerinin kasılma kuvvetinde azalma meydana geldiği ve bununda vanadyum uygulamasıyla giderilebileceği gösterilmiştir (45). Nagareddy ve ark.'nın (44) Wistar cinsi erkek sıçanlara 9 haftalık periyot boyunca sodyum tungstat vererek yaptığı çalışmada, sodyum tungstat'ın STZ-diyabetik sıçanlarda sol ventrikül basıncını (LVP), kasılma hızını (+dP/dT) ve gevşeme hızını (-dP/dT) iyileştirerek kalp fonksiyonunda olumlu etkiler yarattığı ve bunun sonucunda kardiyomiyopatiyi engellediği belirtilmiştir. Sodyum tungstat'ın diyabetik kalpte yarattığı bu olumlu etkinin XO inhibitörü olması nedeniyle antioksidan özelliğinden kaynaklanabileceği iddia edilmiştir (44).

2.4. Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içindedir ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif

denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur ve bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır. Oksidatif stres, doku hasarı gibi patolojik durumların gelişmesine neden olur (73). Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve yapılarının bozulmasına neden olurlar. Biyolojik sistemlerde, süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$), peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenleridir (74, 75).

2.4.1. Serbest Radikaller ve Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Aerobik canlılar yaşamları için mutlaka moleküler oksijene gereksinim duyarken, anaerobik canlılar büyüme ve çoğalmaları için oksijene bağımlı değildirler. Anaerobik canlılardaki oksijenin toksik etkisinin nedeni, oksijenden kaynaklanan bazı reaktif türlerin biyolojik molekülleri oksitlemeleri ve bu reaktif türlere karşı anaerobik canlılarda savunma sisteminin bulunmamasıdır. Oksijen sadece anaerobik türlerde değil, yaşamları için mutlaka moleküler oksijene bağımlı olan canlılarda da toksik etkilere sahiptir. Oksijenin canlılardaki toksik etkisinin “oksijen radikalleri” olarak adlandırılan ve oksijenin vücuttaki metabolizması sırasında oluşan reaktif türlerden kaynaklandığı bilinmektedir.

Serbest Radikal Kavramı:

Stabil moleküllerin çoğunun dış yörüngelerinde biri diğerine zıt yönde hareket eden elektron çiftleri bulunmaktadır. Bu elektron çiftleri, molekülün kararlı kalmasını sağlar. Dış yörüngelerinde en az bir adet eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküle serbest radikal denir (76-78). Serbest radikaller rastlantısal bir şekilde metabolizmanın yan ürünleri olarak veya belli bir amaca yönelik olarak hücre içerisinde sürekli üretilirler.

Serbest Radikal Oluşumu:

Radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşur.

1. Normal bir molekülün kovalent bağının homolitik ayrılmasıyla: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de eşleşmemiş elektron kalır.
2. Normal bir molekülün elektron kaybetmesiyle: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülün elektron kaybetmesinin ardından dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa radikal formu oluşur.
3. Normal bir moleküle elektron eklenmesiyle: Radikal özelliği taşımayan moleküle bir elektron transferi ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşuyorsa bu tür indirgeme radikal oluşumuna neden olur (79).

Bir radikal, radikal olmayan bir moleküle reaksiyona girerse, başka bir serbest radikal oluşur. Bu özellik serbest radikallerin zincirleme reaksiyonlara

girebilmelerine olanak sağlar (80).Biyolojik etkileri en önemli olan serbest radikaller oksijenden oluşan serbest radikallerdir.

Oksijen ve Oksijen Radikalleri:

Moleküler Oksijenin Özellikleri:

Moleküler oksijen (O_2), paralel spin durumlu iki eşleşmemiş elektrona sahiptir. Serbest radikal tanımına göre O_2 , biradikal olarak değerlendirilir (81). Biradikal bir yapıya sahip olan oksijenin herhangi bir molekülle tepkimeye girebilmesi için, tepkimeye gireceği molekülün de benzer yapıya (farklı orbitallerde spinleri aynı yönde elektron içermesi) sahip olması gerekir. Oysa başta organik moleküller olmak üzere atom ve moleküller orbitallerinde elektronları antiparalel ve eşleşmiş olarak içerirler veya paylaşılmamış elektronlar kovalent bağlara katılmışlardır. Bunun sonucu olarak oksijenin diğer moleküllerle olan reaktivitesi son derece kısıtlanmıştır. Bu kısıtlama “spin kısıtlaması” olarak adlandırılır. Canlıların oksijeni kullanabilmesi için oksijene elektron transferi yaparak spin kısıtlamasını aşmaları gerekir. Bu işlem için canlılar bazı metal iyonlarından (Fe, Cu, Mn, Zn) yararlanırlar.

Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest oksijen radikalleri (ROS) oksijenli solunum metabolizması esnasında oluşur. Bu oluşan radikallerin yarılanma ömürleri birkaç milisaniye ile dakikalar hatta saatler arasında değişmektedir (82). Reaktif oksijen türlerinin simgeleri ve elektron yapıları Tablo 2.1’de verilmiştir.

Serbest oksijen radikalleri biyokimyasında anahtar rol oynayan maddeler O_2 , $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , geçiş metal iyonları ve $\cdot OH$ ’dir. Bunlardan ilk dördünün reaksiyonu ile $\cdot OH$ oluşmaktadır (Şekil 2.3) (84, 85). Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilir ve hücrede karbon merkezli organik radikaller ($R^{\cdot}$), peroksit radikali ($ROO^{\cdot}$), alkoksi radikalleri ($RO^{\cdot}$), tiyil radikalleri ($RS^{\cdot}$), sülfenil radikalleri ($RSO^{\cdot}$) ve tiyil peroksit radikalleri ($RSO_2^{\cdot}$) gibi çeşitli radikallerin oluşumuna neden olurlar.

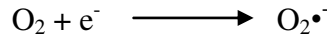
Tablo 2.1. Reaktif oksijen türlerinin simgeleri ve elektron yapıları (83).

Reaktif Oksijen Türleri	Simgesi	Elektron Yapısı
Stüperoksit radikali	$O_2^{\cdot-}$	$\left[\cdot \ddot{O} :: \ddot{O} \right]^{-}$
Hidroksil radikali	$\cdot OH$	$\cdot \ddot{O} : H$
Peroksit radikali	$O_2^{-2\cdot}$	$\left[\cdot \ddot{O} :: \ddot{O} \cdot \right]^{-2}$
Hidrojen peroksit	H_2O_2	$H : \ddot{O} :: \ddot{O} : H$
Singlet oksijen	1O_2	$\cdot \ddot{O} :: \ddot{O} \cdot$

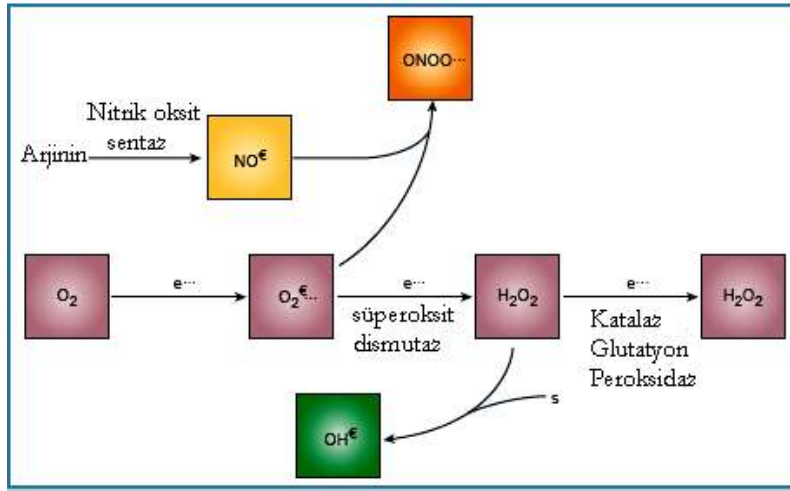
Atmosferik bir bileşik olan ozon (O_3), nitrik oksit radikali ($NO\bullet$) ve hipoklorik asit ($HOCL$) gibi çeşitli moleküller de güçlü oksidan etkiye sahiptir (85, 86)

Süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$):

Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu $O_2^{\bullet-}$ meydana gelmektedir (83).

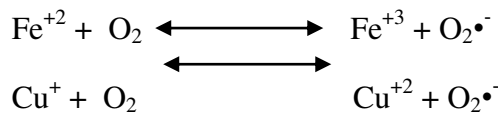


Süperoksit anyonu, hücre membranlarından kolay geçemediği için kendisi doğrudan zarar vermemektedir (85). Süperoksitin asıl önemi, geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi ve hidrojen peroksit kaynağı olmasıdır (83).



Şekil 2.3. ROS (Reaktif oksijen türleri)'un oluşumu (87)

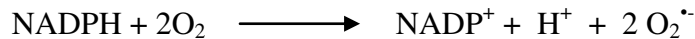
İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit meydana getirebilir.



Geçiş metalleri iyonlarının oksijenle reaksiyonları geri dönüşümlü reaksiyonlardır.

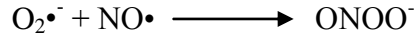
Pek çok enzimin katalitik etkisi sırasında $O_2^{\bullet-}$ bir ürün olarak da oluşabilir.

Aktive edilen fagositik lökositler antibakteriyel etki için NADPH (β -Nikotin Amid Dinükleotid Hidrojen Fosfat) oksidaz enzimi aracılığıyla bol miktarda $O_2^{\bullet-}$ üreterek fagozom içine ve bulundukları ortama verirler (87, 88).

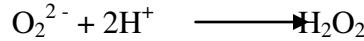
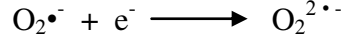


$O_2^{\bullet-}$ bir proton (H^+) alarak $HO_2^{\bullet}$ 'yi oluşturur. Oldukça reaktif olan bu radikal hücre zarlarında lipid peroksidasyonu başlatabilir ve zarla ilişkili antioksidanları oksitleyebilir.

$O_2^{\bullet -}$ 'nin fizyolojik bir serbest radikal olan $NO^{\bullet}$ ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türevi olan peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşmaktadır.

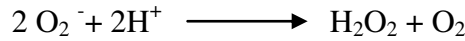


$O_2^{\bullet -}$, yapısına bir e^- katılmasıyla peroksil anyonu (O_2^{2-}) oluşturabilir ve bu da ortamdan iki H^+ alarak H_2O_2 oluşumuna neden olabilir (89).



Hidrojen peroksit (H_2O_2):

Hidrojen peroksitin üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olmaktadır. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturmaktadır. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler oluştuğundan bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinmektedir.

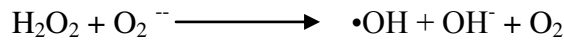


Hidrojen peroksit düşük elektriksel yükü ve noniyonize özelliklerinden dolayı hücre membranlarından hızlı bir şekilde geçer. Geçiş grubu metal iyonlarının varlığında yüksek derecede reaktif serbest radikaller oluşur (85, 90).

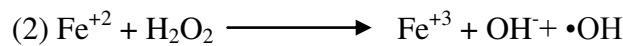
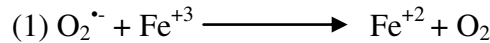
Hidroksil radikali ($\bullet OH$):

Hidroksil radikali, ilk olarak 1934 yılında Haber ve Weiss adlı araştırmacıların gösterdikleri, kendi adları ile anılan reaksiyon ile ortaya konmuştur. En kısa yarı ömre (1×10^{-9} sn) sahip olan $\bullet OH$, biyolojik sistemlerde rastlanan en etkili oksijen radikalidir ve makromoleküller ile kolaylıkla reaksiyona girer (85).

Hidrojen peroksit süperoksit radikali ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşturur. Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilmektedir.

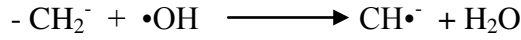
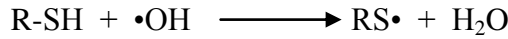


Haber-Weiss reaksiyonu genellikle fizyolojik durumlarda yavaştır. Fakat geçiş metalleri, metal şelatörler veya hemoproteinlerin varlığında bu reaksiyon hızlı oluşur. Bu durum Fenton reaksiyonu olarak tanımlanır. Biyolojik sistemlerde demir benzeri geçiş metalleri, demir içeren maddeler (transferrin, laktoferrin, hemoglobin, adenosin, 5'-difosfat ferrin iyon) mevcuttur. Süperoksit radikali ferrik (Fe^{+3}) demiri, ferröz (Fe^{+2}) demire indirger. Bu sırada H_2O_2 , hidroksil radikaline dönüşür (91, 92).



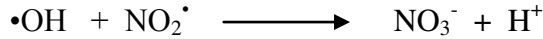
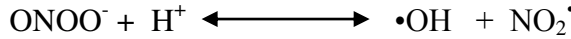
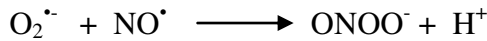
Hidroksil radikali oluştuğu yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri ($RS^{\bullet}$), karbon merkezli organik

radikaller ($R^\bullet$), organik peroksitler ($RCOO^\bullet$) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur.



Nitrojen Oksitleri:

Nitrik oksit ($NO^\bullet$) ve nitrojen peroksit ($NO_2^\bullet$), tek sayıda e^- içerdikleri için serbest radikal tanımına uymaktadır. Biyolojik sistemlerde oluşan reaktif nitrojen türlerinin en önemlisi $NO^\bullet$ 'dur. Nitrik oksitin kontrolsüz üretimi sonucu proteinlerin nitrolizasyonu, DNA kırılmaları ve diğer moleküler etkileşimler ile beyin dokusunu hasarlayabilir (93). İn vivo ortamda salınan $NO^\bullet$, $NO_2^\bullet$ veya nitrat ($NO_3^\bullet$)'a otookside olabilir. $NO_2^\bullet$ zayıf bir redükte edicidir. Fizyolojik pH'da $NO^\bullet$, bir reaktif ara ürün olan $ONOO^-$ 'yu oluşturmak üzere $O_2^\bullet$ ile reaksiyona girebilir. Radikal olmayan $ONOO^-$, güçlü bir oksidandır. Tiyo gruplarının oksidasyonu yoluyla direkt sitotoksik etki gösteren $ONOO^-$, çeşitli nitrojen oksit radikallerini ve $\bullet OH$ oluşturarak dekompoze olabilir (94).



2.4.2. Serbest radikallerin etkileri:

1956'da Denham Harman, oksijen radikallerinin in vivo enzimatik reaksiyonların ürünü olabileceği hipotezini ortaya atmış ve serbest radikallerin büyük çaplı hücresel hasar, mutagenез, kanser ve biyolojik yaşlanmanın dejeneratif süreçlerinden sorumlu olabileceğini ileri sürmüştür (95). Bu hipotezden yola çıkılarak yapılan araştırmalarla serbest radikallerin organizmadaki önemi anlaşılmıştır.

Serbest radikaller toksik etkilidir. Yaşlanma ve çeşitli patolojik durumlarda üretimleri antioksidan savunma sisteminin kapasitesini aştığı zaman hücresel makromoleküllerden lipidler başta olmak üzere DNA, protein ve karbonhidratlar ile reaksiyona girerler. Sonuçta hücrenin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü bozulur ve geri dönüşümlü veya dönüşümsüz hasarlar meydana gelir. Oksijen radikallerinin fazla yapımının neden olduğu etkilerin toplamı "oksidan stres" olarak adlandırılır (96, 97). Kontrolsüz ROS artışının etkileri sonucu hücre apoptoz ya da nekroz ile ölüme gider (98).

Serbest radikallerin lipidlerle reaksiyonu:

Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturmaktadır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin (poly unsaturated fatty asid- PUFA) oksidatif yıkımı olan lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin PUFA'nın yan zincirlerindeki metillenmiş karbonlardan hidrojen atomu koparmasıyla başlar. PUFA'nın oksidasyonu, bir oksijen alarak çabucak peroksil radikaline ($LOO^\bullet$) dönüşebilen yağ

asidi radikalinin (L•) oluşmasına yol açar (78, 99). Peroksil radikali, membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını koparıp peroksidatif zincir reaksiyonunu başlatmaktadır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra devam eder (99, 100).

Lipid hidroperoksitler de (LOOH) yıkılarak LO•, LOO• gibi radikaller, hidrokarbonlar, alkoller ve eterin yanında MDA ve 4-HNE gibi sitotoksik moleküllerin (101) oluşmasına neden olur. Bunlar peroksidasyonun ikincil ürünleridir. 4-hidroksinonenal, proteinlere konjuge olmak için sistein, lizin ve histidin rezidüleri ile etkileşir ve amino asit modifikasyonlarına sebep olur. Malondialdehit ise, membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olmakta, membranın bazı özelliklerini değiştirmektedir. Dolayısıyla MDA hücre ve dokulardaki oksidatif hasarın bir göstergesidir. MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonu sonucunda TBARS meydana gelmektedir. Bu test ile MDA ölçümü PUFA'nın peroksidasyonunun tespit edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (102-104).

Biyolojik membranlarda lipid peroksidasyonu, membran akışkanlığının azalmasına, membran potansiyellerinin düşmesine, H⁺ ve diğer iyonların geçirgenliğinin artmasına ve sonuçta hücre membranının parçalanarak organellerin dışarı sızmasına neden olur (105).

Serbest radikallerin proteinlerle reaksiyonu:

Proteinler oksidanlara maruz kaldıklarında birçok kovalent değişikliklere uğrar. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin proteinler üzerine doğrudan etkileri sonucu oluşabileceği gibi, bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent bağlanması ile meydana gelir. Proteinlerin radikal aracılı hasarı; elektron kaybı ve metal-iyon katalizli reaksiyonlar ile başlatılabilmektedir (106). Proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme dereceleri aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren moleküllerin serbest radikal reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallere karşı daha duyarlıdır. Aminoasitlerin oksidasyonu proteinlerde fragmentasyon, agregasyon ve proteolitik yıkıma duyarlılık gibi fiziksel değişikliklere neden olmaktadır (60, 107).

Proteinlerin oksidasyonu ile özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşmaktadır. Sonuç olarak immünglobulin ve albümin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin yapıları bozulmakta ve bu proteinler fonksiyonlarını yerine getirememektedir.

Proteinlerin oksidasyonu sonucu membran enzimlerinin aktivitesi azalmakta, hücreye Ca²⁺ girişi artmaktadır. Hücre içi serbest Ca²⁺ artışına bağlı olarak zararlı etkilere sahip pek çok enzimin aktivitesi artmakta, bu da hücre hasarına yol açmaktadır.

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri:

Yapılan çalışmalarda, α-hidroksialdehid yapıya sahip karbonhidratların, metal iyonlarının varlığında hızlı bir şekilde otooksidasyona uğradıkları ve bunun sonucunda dikarbonil bileşikleri ve hidrojen peroksit oluşturdıkları belirtilmiştir (85, 108).

Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri:

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme neden olmaktadır. Hücre içinden ve dışından kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açmaktadır (85, 109, 110).

2.4.3. Ksantin Oksiredüktaz Sistemi

Ksantin oksiredüktaz, pürin katabolizmasında görev yapan kompleks bir enzim olup, hipoksantin/ksantinden ürik asit oluşumunu katalizler (111).

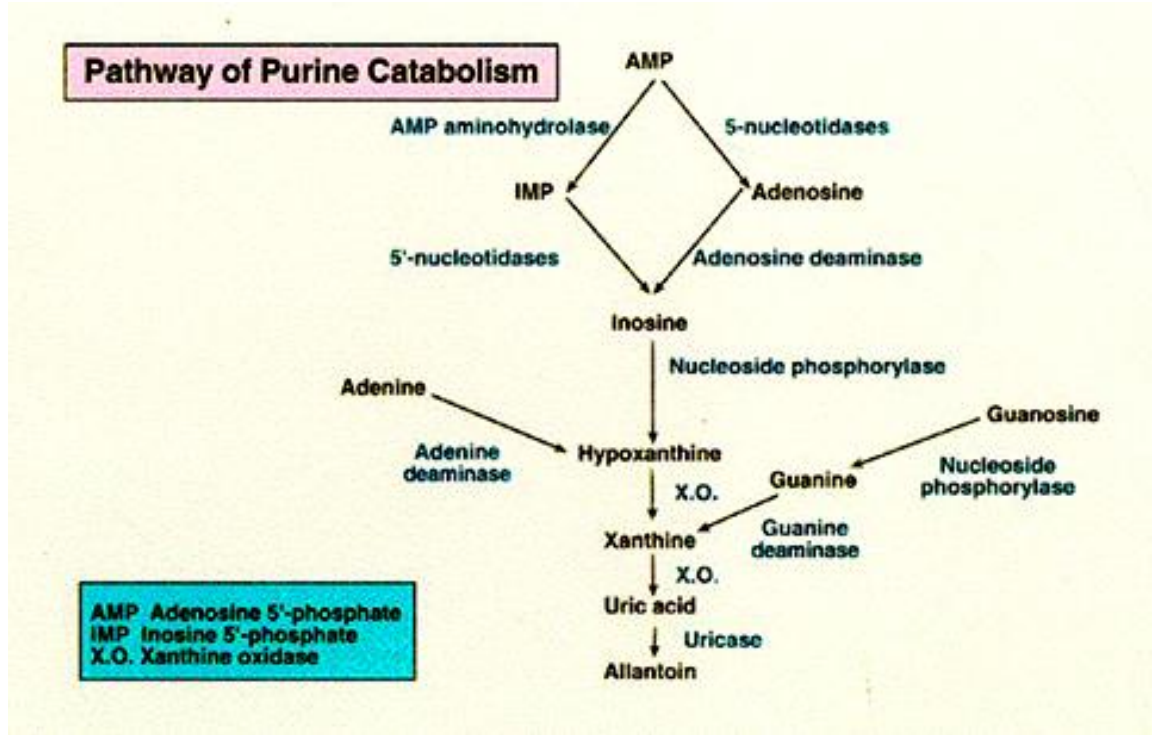
Ksantin Oksiredüktazın Yapısı:

Ksantin oksidaz (XO) ve ksantin dehidrogenaz (XDH) enzimlerinin her ikisi de molibdenyum hidroksilaz flavo protein ailesi üyesidir. Bu iki enzim formu ve reaksiyonlarından genellikle 'XOR aktivitesi' olarak söz edilir. Ksantin oksidaz yaklaşık 300 kDa ağırlığında olup homodimer yapıdadır. Her bir ünitesi molibdenyum kofaktör, flavin adenin dinükleotid(FAD) ve iki adet demir sülfür molekülü içerir (111).

Bakteriden insana kadar geniş bir dağılım gösteren (111) XOR'ın, katalitik özellikleri, kofaktörleri ve temel düzenlemeleri rat, fare ve insanda yaklaşık %90 oranında benzerlik göstermektedir (112, 113). İnsanda XOR geni 22. Kromozomun kısa kolunda bulunur ve yaklaşık olarak 6000 baz çifti büyüklüğündedir (111).

Ksantin oksiredüktazın görevleri:

Fizyolojik koşullarda hücrede esas olarak enzimin XDH formu bulunur. XDH elektron alıcısı olarak NAD^+ kullandığı için metabolitleri zararlı değildir. İskemik dokularda XDH formu XO formuna dönüşür ki, XO formu elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanır. Bu reaksiyon sonucunda süperoksit ve hidrojen peroksit oluşur. Oluşan reaktif oksijen türleri ve süperoksit radikali hücre için zararlı olabilir.



Şekil 2. 4. XO'nun pürin metabolizmasında görevi.

Granger ve arkadaşları (114) XO'nun, iskemi-reperfüzyon patogeneğinde kilit rol oynadığını belirtmektedirler. Dokulara kan akımının ATP oluşturamayacak kadar azalması sonucu trans-membran iyon gradiyenti yok olur.

Bunun sonucunda, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artışı, XDH formunun, XO formuna geri dönüşümsüz olarak çevrimine neden olan proteazları aktive eder (114). Ayrıca hücre içi ATP düzeylerinin azalması, AMP konsantrasyonunun artmasına neden olur. AMP, sırasıyla adenosin, inosin ve hipoksantine yıkılır. Sonuç olarak, iskemi sırasında ksantin oksidaz enzimi aktive olur ve enzimin substratı ortamda hazır hale gelir. Reperfüzyon sürecinde tekrar oksijene maruz kalınmasıyla XO ve hipoksantin birlikte süperoksit ve hidrojen peroksit üretir. Bu reaktif oksijen türleri hidroksil radikalleri ile de etkileşerek serbest radikal oluşumuna katkıda bulunur. Birçok çalışmada barsak (114), böbrek ve karaciğerde (114) iskemi reperfüzyon hasarında XO'nun rolü gösterilmiştir. XO, allopurinol veya oksipurinol gibi spesifik inhibitörlerle inhibe edildiğinde ise hasarda azalma olduğu ortaya konmuştur.

2.4.4. Antioksidan Savunma Sistemi

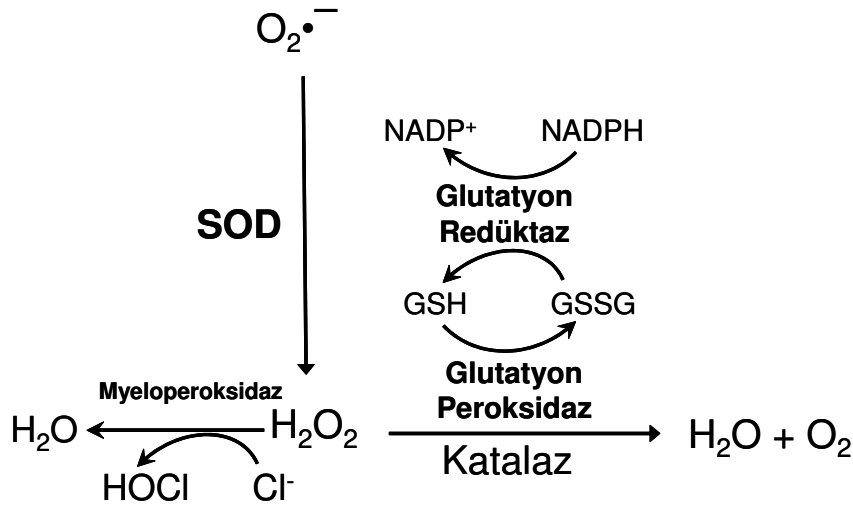
Sağlıklı bireylerde normal metabolizma sonucunda oluşan ROS zararlı etkilerinin dışında, organizmanın yabancı maddeler ve infeksiyon ajanlarına karşı savunmasında yararlı etkilere sahiptir. Fakat bu etkilerin bir dengede tutulması gerekir (115). Bu dengenin bozulması ve ROS'ların artması halinde hem hücre içinde, hem de hücre dışında oluşan radikallerin zararlı etkileri antioksidan savunma sistemi öğelerinin ortaklaşa çalışmaları sonucu ortadan kaldırılır (116). Bu savunma sistemini superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon reduktaz (GSSGR), mitokondriyal sitokrom oksidaz

enzimleri ve C, A, E vitaminleri gibi antioksidan bileşikler oluşturur (115).

Primer antioksidan savunma:

Antioksidan enzimler:

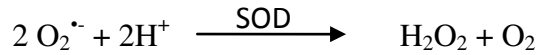
Hücrede oluşan ROS'un sitotoksik etkisinin ortadan kaldırılabilmesi veya azaltılabilmesi antioksidan enzim sistemleri ile mümkün olabilmektedir (117). Bu enzimler, sitoplazmik, mitokondriyal ve ekstrasellüler SOD, GSH-P_x, CAT ve fagositik hücrelerde mevcut olan myeloperoksidaz enzim sistemleridir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Antioksidan enzim sistemleri

Süperoksit dismutaz (SOD):

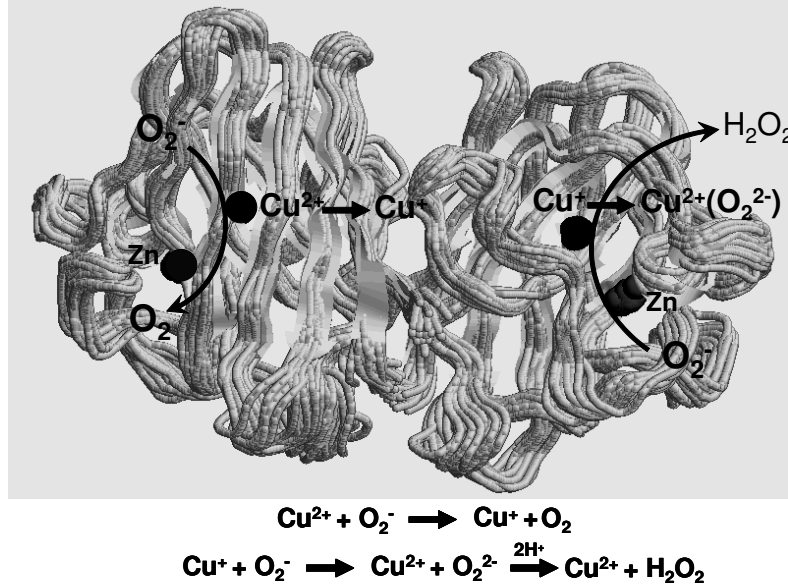
İlk kez 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanan SOD enzimi homodimerik yapıda olan 32 kDa'luk bir proteindir (Şekik 2.6). Süperoksit dismutaz iki tane $O_2^{\bullet-}$ alarak OH ve O_2 oluşturur (118, 119).



Bu reaksiyon oksidatif strese karşı ilk savunma olarak da adlandırılır. Çünkü aerobik koşullarda yaşayan tüm canlılarda kaçınılmaz bir şekilde meydana gelen $O_2^{\bullet-}$ zincirleme radikal reaksiyonların güçlü bir başlangıcıdır. Katalitik aktivitesi oldukça yüksek olan SOD enzimi sayesinde hücresel kompartmanlardaki $O_2^{\bullet-}$ düzeyleri kontrol altında tutulur. SOD, oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunur, ancak yüksek oksijen kullanımı olan dokularda aktivitesi fazladır (118, 119, 120).

Ökaryotik hücrelerde aktif bölgelerindeki metal türü ve hücredeki yerleri açısından üç farklı SOD enzimi tespit edilmiştir. Kofaktörleri bakır ve çinko olan Cu/Zn-SOD intraselüler olarak sitoplazma, çekirdek ve lizozomlarda, ekstrasellüler olarak ise plazma membranlarında ve hücre dışı sıvılarda tespit edilmiştir. Bu

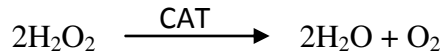
enzimin aktivitesinden Cu, stabilitesinden Zn sorumludur. Cu/Zn-SOD enziminin yapısı ve fonksiyonu Şekil 2.6'da verilmiştir. Kofaktörü mangan olan Mn-SOD ise intraselüler olarak mitokondrial matriks, ekstraselüler olarak ise plazma membranında bulunmuştur. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer Cu/Zn-SOD'dur. Bu SOD izomerlerinin katalizlediği reaksiyonlar aynıdır. Bunların dışında bazı bakterilerde kofaktörü demir olan Fe-SOD saptanmıştır. Fizyolojik pH'da bu enzim tarafından katalizlenen reaksiyonun hızı yaklaşık $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 'dir. Bu hız, süperoksit anyonunun spontan dismutasyonundan 10^4 kere daha hızlıdır (121).



Şekil 2.6. Süperoksit dismutaz enziminin yapısı ve fonksiyonu

Katalaz (CAT):

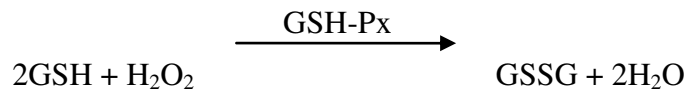
Peroksidazların bir üyesi olan katalaz, yapısında dört 'hem' grubu bulunduran 220 kDa moleküler ağırlıklı bir hemoproteindir. Katalaz hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktadır. Peroksizomlarda lokalizedir (118).

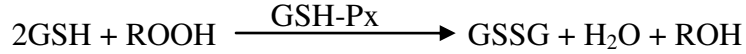


H_2O_2 seviyesinin düşük olduğu durumlarda, organik peroksitler tercihen peroksidaz tarafından metabolize edilirken, H_2O_2 konsantrasyonunun yüksek olduğu koşullarda katalaz tarafından metabolize edilirler (122, 123).

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px):

Glutasyon peroksidaz, ilk kez 1957 yılında tanımlanmıştır. Tetramerik yapıda olan enzim, H_2O_2 ve büyük moleküllu hidroperoksitlerin indirgenme reaksiyonlarını katalizler (118, 124).





Glutasyon peroksidazın 85 kDa moleküler ağırlıklı sitozolik formuna ilaveten böbreklerde sentezlenen ve salınan 90 kDa moleküler ağırlıklı bir plazma formunun varlığı da gösterilmiştir (125, 126). Selenyum (Se) bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki tipi mevcuttur. Selenyum bağımlı formu katalitik aktivitesi için selenyuma ihtiyaç duyar (85, 127). GSH-Px, karaciğerde yüksek, kalp, akciğer ve beyinde orta, kasta ise düşük aktiviteye sahiptir.

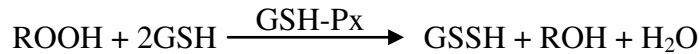
Glutasyon redüktaz (GSSG-R):

Glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyon sırasında meydana gelen GSSG'nin ileride tekrar GSH'ya dönüştürülmesi gereklidir, çünkü organizmanın GSH deposu sınırlıdır. Bu fonksiyonu Glutasyon redüktaz (GSSG-R) enzimi yerine getirir. Bir flavoprotein olan GSSG-R enzimi, NADPH varlığında GSSG'yi tekrar GSH'ya çevirir. Yaklaşık olarak 104 kDa moleküler ağırlıklı GSSG-R enzimi iki alt ünitelerden oluşan dimerik yapıya sahiptir (128).



Glutasyon-S-transferaz (GST):

Glutasyon-S-transferaz (GST), ilk kez 1961 yılında tanımlanmıştır. Dört farklı alt birimden oluşan 101 kDa moleküler ağırlıklı bir enzim ailesidir (129, 130). Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadır. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitler (ROOH)'e karşı Se-bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterir.



Mitokondrial Sitokrom Oksidaz:

Mitokondrial sitokrom oksidaz enzimi solunum zincirinin son bileşenidir. Enzim, elektronlarını $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$ 'ye vererek $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$ 'nin detoksifikasyonunu sağlar. Normal koşullarda sürekli meydana gelen bu reaksiyon sayesinde yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanarak bol miktarda enerji üretimi sağlanır. $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$ üretiminin bu enzimin kapasitesini aştığı koşullarda ise diğer antioksidan enzimler devreye girer $\text{O}_2^{\cdot\cdot}$ 'nin zararlı etkilerini engeller (83).

Antioksidan Bileşikler:

Bu gruba ait moleküler ve iyonlar ekzojen ve endojen kaynaklı olarak organizmada bulunur ve oksidanlara karşı enzimatik olmayan bir savunma gösterirler. GSH, çeşitli vitaminler, melatonin, niasin, triptofan, riboflavin, α -lipoik asit, biyoflavonoidler, koenzim Q, ürik asit, seruloplazmin ve sistein, bu grup içinde sayılabilirler.

Glutasyon (GSH):

Tüm hücrelerde bulunan düşük moleküler ağırlıklı bir tiyoldür. Başlıca intraselüler antioksidan GSH, ekstraselüler mesafede çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. Glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden meydana gelen GSH'ya antioksidan özelliğini sistein tiyol grubu kazandırır.

Redükte glutasyon, $O_2^{\bullet}$, $\bullet OH$ ve H_2O_2 gibi bileşiklerle etkileşerek indirgeyici görev görür, böylece hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Redükte glutasyon doğrudan süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve organik radikallerle reaksiyona girip yükseltgenebilir veya A vitamini gibi antioksidanların yükseltgenmiş formdan indirgenmiş forma geçmesini sağlayarak antioksidan etki gösterir (85, 131). Bunun dışında proteinlerdeki $-SH$ gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı muhafaza eder. Redükte glutasyon, demirin Fe^{+2} halde tutulmasını sağlayarak protein ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller.

MATERYAL METOD

3.1. Deney Grupları ve Diyabetin Oluşturulması

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik, Biyokimya ve Deney Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilen çalışmamızda 80 adet 3 aylık, ortalama 300-350 gr ağırlığında, erkek Wistar türü sıçan kullanılmıştır. Deney Hayvanları Ünitesinden alınan toplam 80 adet sıçan her grupta 20 hayvan olacak şekilde dört gruba ayrılmıştır.

Grup 1: Kontrol grubu (Kon)

Grup 2: Sodyum Tungstat grubu (Kon-Tg)

Grup 3: Diyabet grubu (DM)

Grup 4: Diyabet – Sodyum Tungstat grubu (DM-Tg)

3.2 Deney Protokolü

Hayvanlar, deney süresi boyunca her kafeste 3 tane olacak şekilde, su ve yem kısıtlaması olmaksızın tutulmuşlardır. Diyabetik hayvan modeli oluşturmak üzere, hayvanlara tek doz streptozotocin (STZ; 50 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edildi. STZ enjeksiyonundan bir hafta sonra hayvanların kan glikoz düzeyleri ölçülerek, diyabetik olmayan hayvanlar deney dışı tutulmuşlardır. Kan glikoz düzeyleri 300 mg/dl ve üzerinde olan hayvanlar diyabetik olarak kabul edilmiş ve iki gruba ayrılmışlardır. Diyabetli olan iki gruptan birincisine (DM), altı hafta boyunca her gün gavaj yoluyla doğrudan mideye su verilirken, diğer gruba (DM+Tg) 100 mg/kg/gün dozunda aynı süre ve aynı yöntemle sodyum tungstat verilmiştir.

Kontrol grubu (Kon) hayvanlarına STZ taşıyıcısı olan sitrat (0,1 mol/l, pH=4,5 sitrat tamponu) enjeksiyonunu takip eden yedi günün ardından, her gün hayvan ağırlığına uygun olarak dört hafta boyunca mideye gavaj ile su verilmiş, ikinci gruba (KON-Tg) ise günde 100 mg/kg/gün olacak şekilde sodyum tungstat yine aynı yolla, aynı süre boyunca uygulanmıştır.

Altı haftalık deney sürecini takip eden yedinci hafta içerisinde, kan glikozu düzeyleri ve vücut ağırlıkları tekrar ölçüldükten sonra sıçanlar kesilmişlerdir. Gruplardaki hayvanların bir kısmının kalpleri çıkarılarak enzimatik yoldan kardiyomiyosit izole edilerek, tek hücre deneyleri gerçekleştirilmiştir.

3.3. Kardiyak Miyositlerin İzolasyonu

Deney gruplarında bulunan hayvanların anestezi altında (50 mg/kg sodyum pentobarbital) kalpleri hızlı bir şekilde çıkarıldıktan sonra Langendorff sistemine bağlanmıştır. Daha önce başka araştırmacıların kullandıkları enzimatik yöntem takip edilerek (132), asılı kalpler önce içeriği (mM): 137 NaCl; 5,4 KCl; 1,2 MgSO₄; 1,4

K₂HPO₄; 6 HEPES; 20 Glikoz (pH= 7,2) olan ve sürekli %100 O₂ ile gazlanan, kalsiyumsuz perfüzyon solüsyonu ile yıkanmıştır. Arkasından, kalbin üzerinden 20 dakika süresince aynı solüsyon içinde hazırlanmış kollajenaz (Roche, Collagenase A type) (0,8 mg/ml) ve proteaz (Sigma type XIV) (0,07 mg/ml) geçirilip uygun kıvama ulaşıldığında, kalp küçük bir kabın içine alınmış ve makasla ince bir şekilde dilimlenmiştir. Daha sonra, ince bir filtreden geçirilerek hücreler bir tüpün içerisine alınmış ve birkaç yıkama işleminden geçirilmiştir. Ortamdaki Ca²⁺ aşamalı olarak artırıldıktan ve hücreler 1 saat kadar bekletildikten sonra akım kayıtlarına geçilmiştir. Ayrıca, biyokimyasal parametreler için deneklerin bir kısmının kalpleri hızlıca alınarak Tyrode solüsyonu ile perfüze edildikten sonra sıvı nitrojen tüpü içine konularak biyokimyasal deneylerin yapıldığı zamana kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.4. Potasyum Akımlarının Kaydedilmesi

Bütün akımlar voltaj kenetleme yönteminin tüm-hücre konfigürasyonunda alınmıştır. Bunun için, hücrenin GΩ düzeyinde direnç oluşturacak şekilde elektrod ucuna yapışması sağlandıktan sonra, elektrik pulsu uygulanarak hücre zarı kırılmıştır. Kenetlemeden sonra zar potansiyeli -70 mV düzeyinde tutulan hücrelere 1000 ms'lik pulslar 5 s'lik aralıklarla ve 10 mV'luk basamaklar şeklinde -60 mV'tan +60 mV'a kadar 13 defa uygulanmıştır. Patch-clamp amplifikatörünün (Axon 200B, Moleküler Devices, USA) voltaj kenetleme modunda 3 kHz'lik filtreden geçirilen potasyum akımları, Digidata 1200'ün 5 kHz'lik örnekleme hızında pClamp 10 yazılımı (Axon Instruments, Foster City CA, USA) ile kaydedilmiştir. Kayıt için 1.5-2.5 MΩ'luk elektrodlar kullanılırken, kenetleme sonrası giriş (access) direncinin 6 MΩ ve altında olmasına özen gösterilmiştir. Akım kayıtları için gerekli hücre dışı ortam kapiller borular kullanılarak ve yerçekimi etkisi ile direk hücre üzerine uygulanmıştır. Bu akımlar için kullanılan çözeltiler banyo için (mM): 137 NaCl; 5,4 KCl; 1,5 CaCl₂; 0,5 MgCl₂; 10 Glikoz; 11,8 HEPES (pH=7,4), pipet için ise (mM): 120 K-aspartat; 20 KCl; 10 NaCl; 5 MgATP; 10 K-HEPES (pH=7,2) olacak şekilde hazırlanmıştır. Ayrıca, Ca²⁺ akımlarını bloke etmek amacıyla kapiller içi ortama CdCl₂ (250 μM) eklenmiştir. Akımların tepe değerinden 1000 ms'lik pulsun son bölümündeki akım değerleri (I_{ss}) çıkarılarak I_{to} hesaplanmıştır. Daha sonra, her iki akım için ölçülen tepe değerleri hücreler arası büyüklük değişiminden kaynaklanabilecek sapmaları önlemek amacıyla hücre sığasına bölünerek akım yoğunluğu cinsinden değerlendirilmiştir (133, 134).

3.5. L-tipi Ca²⁺ Akımlarının Kaydedilmesi

Bu çalışmada I_{CaL} ölçülmüştür. Bu akımlar tüm hücre voltaj kenetleme konfigürasyonunda 1.5-2.5 MΩ'luk elektrotlar kullanılarak alınmıştır. Ölçümler için kullanılan pipet solüsyonu içeriği (mM): 120 Cs-aspartat; 20 CsCl; 10 NaCl; 5 MgATP; 10 EGTA ve 10 HEPES (pH= 7.2) olacak şekilde hazırlanmıştır. Kayıt için, hücreler -70 mV düzeyinde kenetlenerek eğimli bir voltaj uygulaması ile zar potansiyeli -45 mV'a kenetlenmiş, bu seviyede bir süre beklenerek sodyum (Na⁺) akımları inaktif hale getirilmiştir. Sonra -50 mV'tan 10 mV'luk artışlarla +70 mV'a 300 ms'lik depolarize edici pulslar uygulanarak 12 farklı voltaj seviyesinde kayıtlar alınmış ve bilgisayara kaydedilerek Clampfit 10.0 programı ile analiz edilmişlerdir. Tepe değerleri ölçülüp 300 ms'nin sonundaki kuyruk akımlarından çıkarılmıştır. Her potansiyel için elde edilen akım

değeri ölçüm yapılan hücrenin ölçülen sıgasına bölünerek değerlendirilmiş ve tüm akım değerleri akım yoğunluğunun voltaja göre değişimi olarak verilmiştir.

3.6. Hücre İçi Serbest Ca^{2+} Derişimi Ölçümü

İzole edilen kardiyomiyositler fura-2 AM (4 μ M) ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildikten sonra, 340 ve 380 nm’de eksite edilerek 510 nm’ ye merkezlenmiş floresan oranların ölçülmesi ile $[Ca^{2+}]_i$ hesaplanmıştır (135).

Hücre içi serbest Ca^{2+} ölçüm deneylerinde kullanılan banyo çözeltisinin içeriği şu şekildedir (mM): 130 NaCl; 4,8 KCl; 1,2 $MgSO_4$; 1,5 $CaCl_2$; 1,2 KH_2PO_4 ; 10 HEPES ve 10 glucose (pH= 7,4). İki ucuna elektrot yerleştirilmiş kuvvet içine alınan hücrelerden uyarılabilir olanı seçilerek bir pencere içine alınmıştır. Önce 20 s’lik bazal Ca^{2+} sinyali kaydedilmiş, sonra hücreler 25-30 V’luk pulslar ile 0.5 Hz frekansında uyarılarak 200 s süreyle geçici Ca^{2+} değişimleri (Ca^{2+} transient) kaydedilmiştir. Arkasından aynı pencere banyonun hücre bulunmayan bir bölgesine odaklanarak belli bir süre kayıt alınıp hücre içi sinyalden çıkarılmıştır. Böylece, banyo ortamının floresansından kaynaklanabilecek gürültünün ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Gözlenen Ca^{2+} değişimine ait sinyallerin ölçümü bilgisayara kaydedilip değerlendirilmiştir (IonOptix, USA). Her hücre 200 s süresince kaydedilen transientlerin parametrelerinin ortalamasından elde edilen değer ile temsil edilmiştir. $[Ca^{2+}]_i$ sinyallerinin bazal değerden çıkarılarak ölçülen maksimum değeri ($\Delta FFI_{340/380}$), tepeye çıkış süresi (TP) ve üssel fonksiyon uydurularak maksimum değer in %37’sine iniş süresi (τ_{decay}) ölçülerek karşılaştırılmıştır.

3.7. Biyokimyasal Parametreler

3.7.1. Ksantin Oksidaz Miktarı Ölçümü

Ksantin dehidrogenaz enzimi (XDH) proteolitik parçalanma veya moleküller arası disülfid bağı oluşumu ile ksantin oksidaz formuna dönüşür. Projemizde hem kontrol hem de diyabet gruplarında XO ve XDH aktivitelerine bakılmıştır. XDH/XO ölçümleri için alınan myositler soğuk homojenizasyon tamponu (50 mM K_2HPO_4 , 80 mM leupeptin, 2.1 mM Pefabloc SC, 1mM phenylmethylsülfonil fluoride, 1 μ g ml-1 aprotinin, pH 7.4) içerisinde homojenize edildikten sonra, elde edilen homojenatlar 23.000xg’de 40 dk. 4 °C’de santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlarda XO aktiviteleri florometre kullanılarak belirlenmiştir. Protein konsantrasyonu ise 595 nm’de Coomassie reaktifi kullanılarak tayin edilmiş, serum albumini de bu ölçüm için standart olarak kullanılmıştır.

3.7.2. Myositlerde Süperoksid Anyon Salınımının Belirlenmesi

Süperoksid anyon salınımı, CuZn SOD ile inhibe edilebilen sitokrom c redüksiyon ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Salınan süperoksid anyon miktarı redükte sitokrom c’nin 550 nm’deki extinction coefficienti ($2.1 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$) kullanılarak hesaplanmıştır.

3.7.3. Protein Karbonil Gruplarının Ölçümü

Protein oksidasyonunun en yaygın ve genel göstergesi protein karbonil miktarıdır. Demir ve bakır gibi kolay indirgenen ve oksitlenen iyonlar proteinlerde

kation bağlayıcı bölgelere bağlanıp, H_2O_2 ve $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyona girebilirler. Bu reaksiyon sonucunda lizin, arginin, prolin ve histidin gibi aminoasitlerin amin yan zincirlerini karbonillere dönüştürebilir. Kalp dokusu örneklerinde karbonil miktarını belirleyip ölçmek için en uygun yöntem, protein karbonilleri ile 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) arasında reaksiyon oluşturmaktır. Son ürün olarak gösterilen protein hidrazon 360-385 nm'de absorbans vererek spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

3.7.4. GSH Miktarının Ölçümü

Kalp dokusu örneklerinde bulunan redükte glutatyon (GSH) 2 vinylpyridine ile konjuge edildikten sonra, ortalama glutatyon redüktaz enzimi ilave edilip okside glutatyon (GSSG) GSH'ya dönüştürülmüştür. GSH'da bulunan sülfidril grubu 5',5'-dithiobis-2-nitrobenzoic asit ile (DTNB-Ellman reaktifi) reaksiyona sokularak sarı renkli 5-thio-2-nitrobenzoic asit (TNB) oluşturulmuş ve bu reaksiyonun tümünde TNB'nin oluşum miktarından GSSG'ın total miktarı tayin edilmiştir.

3.7.5. Doku Tiobarbitürik Asit Reaktif Ürünlerinin (TBARS) Ölçümleri

Prensip: Bu metodun temel prensibi, lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA, 2-tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi ve oluşan bileşiğin butanol fazına ekstrakte edilerek 525 nm eksitasyon ve 547 nm emisyon dalga boyunda spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanır.

Reaktifler:

1. 29 mM tiobarbitürik asit (Sigma-T5500): 0.418 g TBA, 50 ml distile su ve 50 ml glacial asetik asit (Acetic acid glacial extra pure, Merck-56) içinde çözülmüştür.
2. 5 M HCl (Hydrochloric acid, Merck-314)
3. n-bütanol (n-Butanol, Merck-329)
4. Standart solüsyonu: Tetraetoksipropan (1,1,3,3-tetraethoxy-propane, Sigma-T9889) stok solüsyonundan distile su ile sulandırılarak hazırlanmıştır.

İşlemler: 1 ml distile su içeren tüpe 50 µl doku süpernatantı konulduktan sonra, 1 ml tiobarbitürik asit (TBA, 29 mmol/L) eklenmiştir. Tüp iyice karıştırıldıktan sonra, 1 saat süreyle 95-100 derece arasında kaynatılmıştır. Numuneler soğutulduktan sonra 25 µl HCl (5 mol/L) ve 3.5 ml n-bütanol eklenerek vortekslenmiş ve bu işlemi takiben 3000xg'de 10 dakika santrifüj edilerek, bütanol fazı ayrılmıştır. Bütanol ekstraktının floresansı, eksitasyon dalga boyu 525 nm, emisyon dalga boyu 547 nm olarak spektrofotometrede (Perkin Elmer Luminescence spectrometer, LS50B) okunmuştur.

TBARS miktarının hesaplanması:

1,1,3,3,-tetra-metoksi-propan standardı numune gibi çalışılarak standard grafiği oluşturulmuştur. Dokuların TBARS miktarı bu grafik yardımıyla hesaplandıktan sonra nmol/g protein olarak saptanmıştır.

3.8. Kullanılan Kimyasallar

NaCl, KCl, MgSO₄, CaCl₂, KH₂PO₄, HEPES, glucose, Cs-aspartat, CsCl, MgCl₂, fosfokreatin-Na₂, ATP-Na₂, EGTA, Na₂GTP, CdCl₂, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ ve Sodyum tungstate Sigma (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany)'dan satın alınmıştır. Collagenase A Roche firmasından (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), Fura-2AM ise Molecular Probes (Molecular Probes, USA)'tan satın alınmıştır.

3.9. İstatistiksel Analizler

Deney sonuçlarının ilk aşamadaki analizleri içi one-way anova kullanılmış, ilişkili grupların karşılaştırılması ise Tukey testi ile gerçekleştirilmiştir. Değerler ortalama±SEM olarak verilmiştir ve anlamlı fark $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

4.1. Hayvanların Genel Durumları

Deneyler ortalama 250-300 g ağırlıklarındaki yetişkin (3 aylık) hayvanlar ile gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.1’de görüldüğü gibi başlangıçta tüm deney gruplarının ağırlıkları birbirlerine yakın düzeyde iken, birinci haftadan itibaren diyabetli grupların kilo kazanımında bir duraklama olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında, sodyum tungstat verilen diyabetli grubun kilo kazanımında bir düzelme olmadığı belirlenmiştir. Deney sürecinin sonunda hem DM, hem de DM-Tg grubundaki sıçanların ağırlıklarının kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Buna karşılık Kon ve Kon-Tg gruplarında deney süresi boyunca ağırlıklarda düzenli ve olağan artışın gerçekleştiği tespit edilmiştir (Tablo 4.1). Ayrıca, diyabetik grupta kalp ağırlıkları kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalırken, sodyum tungstat uygulaması diyabetli sıçanların kalp ağırlıklarında herhangi bir düzeltici etkiye yol açmamıştır.

Tablo 4.1. Hayvanların genel parametreleri.

GRUPLAR	Vücut Ağırlığı (g)		Kan glikozu (mg/dl)	Kalp Ağırlığı (g)	Plazma İnsülin (ng/ml)
	Başlangıç	Son			
Kon (n=17)	354.41±15.52	389.24±15.98	119.94±3.04	1.41±0.03	2.46±0.34
DM (n=15)	359.87±17.76	258.67±9.53*	583.20±7.68*	1.16±0.05*	0.83±0.19*
DM-Tg (n=16)	363.133±8.96	279.067±9.55*	577.07±11.51*	1.21±0.03*	0.82±0.26*
Kon-Tg (n=15)	367.125±9.20	399.125±12.30	125.00±2.83	1.46±0.03	3.09±0.36

Yukarıdaki kısaltmalar kontrol (Kon), sodyum tungstat verilmiş kontrol (Kon+Tg) Diyabet (DM) ve sodyum tungstat verilmiş diyabet (DM+Tg) olarak kullanılmıştır. Grupların deney sürecinin başlangıcında ve sonunda ölçülen ağırlıkları (g) ve kan glikozu düzeyleri (mg/dl). Değerler ortalama ±SEM olarak verilmiştir. n= hayvan sayısı; *p<0,05 vs K grubu.

Bunun yanında beklendiği şekilde STZ uygulamasını takip eden 1 haftanın

sonunda kan glikozu düzeylerinin kontrol değerlerine göre ortalama 4-5 kat arttığı belirlenirken, plazma insülin değerlerinin anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir. Deney süresinin sonunda kan glikozu seviyesinin hem DM, hem de DM-Tg grubunda aynı düzeyde olduğu görülürken, plazma insülin seviyesinde de anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Sodyum tungstat uygulaması kontrol sıçanlarının kan glikozu ve plazma insülin değerlerinde önemli bir değişikliğe yol açmamıştır.

4.2. Kasılma ve Hücre içi Ca^{2+} ile İlgili Parametreler

4.2.1. Sarkomer boyu

Diyabetin sıçan kalbinin elektriksel aktivitesinde yol açtığı değişikliklerin fonksiyonel parametrelerle ilişkisini ve sodyum tungstatın bu değişikliklere etkisini belirlemek amacıyla kasılma cevaplarına da bakılmıştır. Bunun için elektrik alan uyarısı altında sarkomer boyundaki kısılmanın başlangıç uzunluğuna oranı (fraksiyonel kısılma) ölçülmüştür. Kalbin mekanik aktivitesine bakıldığında, diyabetin sarkomerin fraksiyonel kısılma miktarını anlamlı şekilde azalttığı ve 6 haftalık sodyum tungstat uygulamasının DM-Tg grubundaki bu değişiklikleri düzelttiği belirlenmiştir. Buna karşılık, Kon-Tg grubunda kontrol değerlerine göre anlamlı bir değişiklik olmamıştır. (Şekil 4.1 A'da görüldüğü üzere)

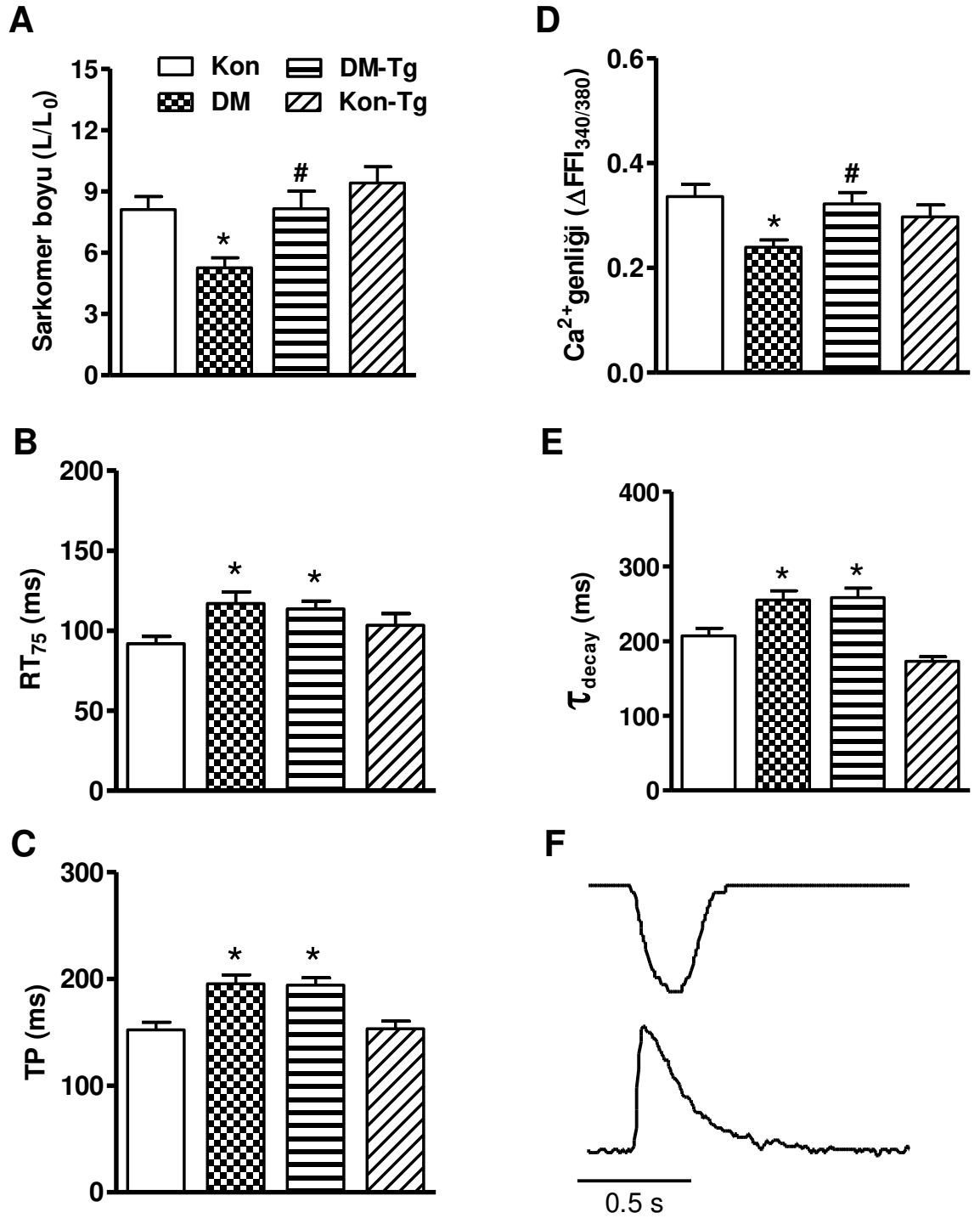
Aynı kayıtların tepeye çıkış (TP) ve gevşemenin %75'ine ulaşma (RT_{75}) süreleri hesaplanarak ortalama değerleri karşılaştırıldığında DM grubunda kontrole göre TP ve RT_{75} sürelerinin anlamlı derecede uzadığı görülmüştür. Buna karşılık sodyum tungstat uygulamasının diyabetli sıçanlarda herhangi bir düzeltici etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Kontrol hayvanlarına 6 haftalık sodyum tungstat uygulamasının TP ve RT_{75} sürelerini Kon grubuna göre yine değiştirmedeği belirlenmiştir (Şekil 4.1 B ve C'de görüldüğü üzere)

4.2.2. Hücre içi Ca^{2+} Transientleri

Diyabet indüklü mekanik yanıtların Ca^{2+} regülasyonu ile ilişkisini ortaya koymak ve sodyum tungstatın bu değişikliklere etkisini değerlendirmek için sarkomer boyundaki değişimle eş zamanlı olarak $[Ca^{2+}]_i$ transientleri de kaydedildi. Bu verilerin analizleri sonucunda elde edilen ortalama değerlerin değişimi fraksiyonel kısılma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Diyabetik kardiomyositlerde $[Ca^{2+}]_i$ transientlerinin genlikleri kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı biçimde azalırken, sodyum tungstat tedavisi uygulanan diyabet grubunda DM grubuna göre anlamlı şekilde artmıştır (Şekil 4.1 D).

İzole edilen kardiomyositlerden kaydedilen $[Ca^{2+}]_i$ transientlerinin geri alım sürecinin %37'sine ulaşma süresinin (τ_{decay}) DM grubunda Kon grubu miyositlerinin değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttığı gözlenmiştir. Uzun süreli tungstat tedavisinden sonra diyabette uzamış olan $[Ca^{2+}]_i$ transienti zaman sabitinin düzelmediği tespit edilmiştir. Bunun yanında Kon-Tg grubunun hem genlik hem de zamansal parametreleri açısından Kon grubu değerlerinden farklı olmadığı görülmüştür (Şekil 4.1 E).

Bütün veriler göz önüne alındığında $[Ca^{2+}]_i$ transientlerinin kinetik analizlerinden ulaşılan sonuçlar kısılma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.



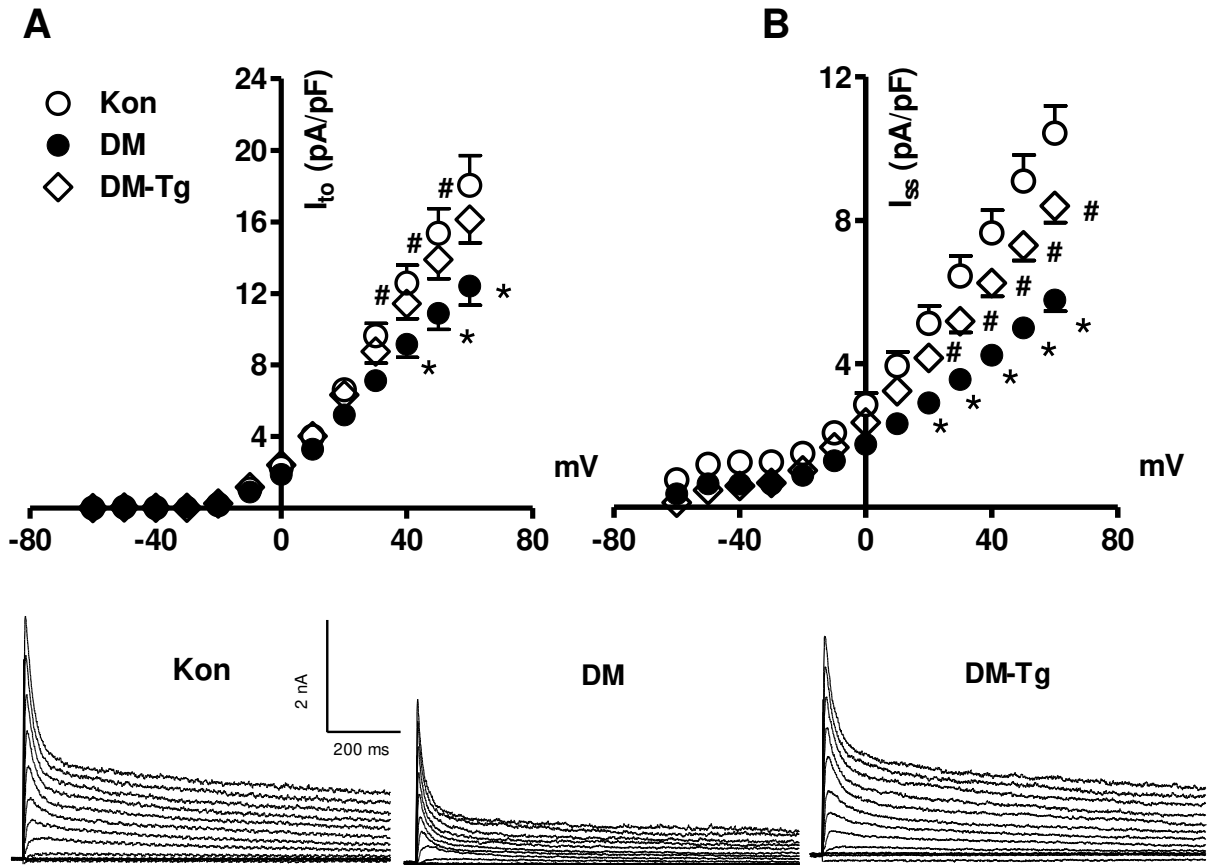
Şekil 4.1. Gruplardan izole edilen Fura 2AM yüklü kardiyomiyositlerin 0.5 Hz frekanslı alan uyarısıyla kaydedilen kasılma yanıtları ve $[Ca^{2+}]_i$ transiyentleri. A. Sarkomer boyu (L/L_0), B. Tepeden relaksasyonun %75 ine iniş süresi (RT_{75}), C. Tepeye çıkış süresi (TP), D. $[Ca^{2+}]_i$ transiyentlerinin genlik değerleri, E. $[Ca^{2+}]_i$ transiyentlerinin zaman sabiti, F. $[Ca^{2+}]_i$ transiyenti ve sarkomer kısalması örneği. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. $n=25-26$ hücre * $p<0.05$ vs. Kon grubu ve # $p<0.05$ vs. DM grubu.

4.3. Potasyum ve Kalsiyum Akımları ile İlgili Bulgular

Uyarılma-kasılma çiftlenimi hücre zarından geçen iyon akımlarının miktarına ve bunların zamansal değişimlerine önemli ölçüde bağlıdır. Bu nedenle, uyarılma-kasılma çiftleniminde oluşan değişikliklerin altında yatan iyonik mekanizmaları açığa çıkarmak amacıyla izole kardiyomiyositlerden K^+ ve I_{CaL} akımları kaydedilmiştir.

4.3.1. Diyabetin ve Sodyum Tungstat Uygulamasının K^+ Akımları Üzerine Etkileri

Aksiyon potansiyelinin repolarizasyon evresine şeklini veren en önemli akımların başında K^+ akımları gelmektedir. Bu nedenle çalışmamızda iki tip K^+ akımı (I_{to} ve I_{ss}) ölçülmüş, bu akımların maksimum değerleri hücre kapasitanslarına oranlanarak akım değerleri akım yoğunluğu (pA/pF) cinsinden verilmiştir. Gruplara ait ortalama akım yoğunluklarının zar potansiyeline göre değişim eğrileri ve örnek akım kayıtları Şekil 4.2’de görülmektedir.



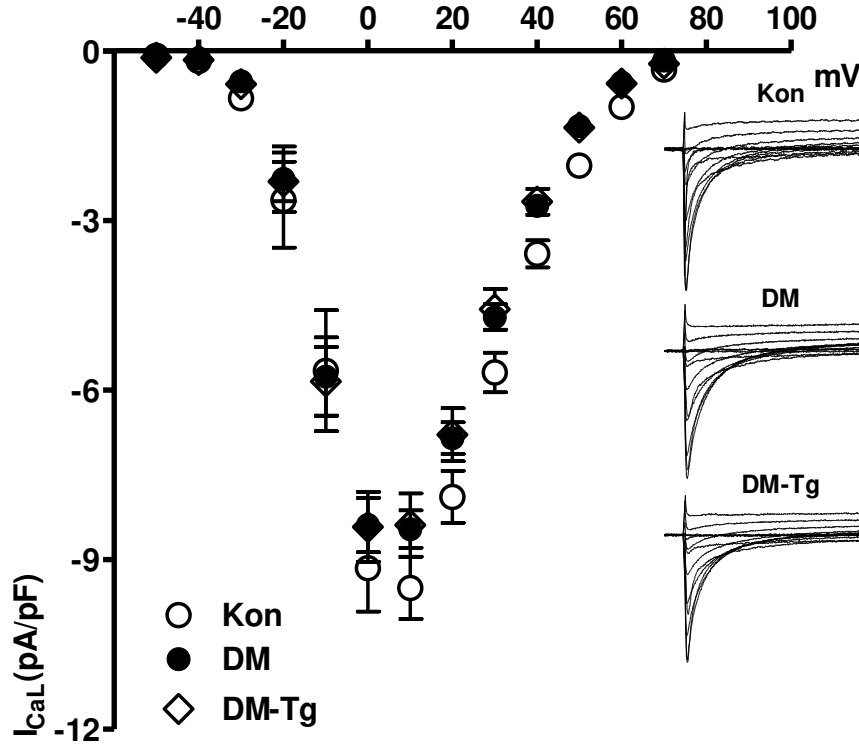
Şekil 4. 2. Gruplara ait akım yoğunluğu-zar potansiyeli değişim eğrileri ve örnek potasyum akımları ve. A. Geçici dışarı doğru (I_{to}), B. Kararlı durumdaki (I_{ss}) K^+ akımlarına ait V-I grafikleri. K^+ akımları -60 mV ile +60 mV arasında 10 mV'luk artışlarla 1 s süreli test pulsları uygulanarak elde edilmiştir. I_{to} , K^+ akımının tepe değerinden kuyruk kısmının (I_{ss}) çıkarılması ile elde edilmiştir. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verilmiştir. * $p < 0.05$ vs. Kon grubu ve # $p < 0.05$ vs. DM grubu ($n = 11-20$ hücre).

Deneyisel verilerin analizi sonucunda kontrol grubuna kıyasla DM grubunda Ito ve Iss akımlarının anlamlı biçimde azaldığı gözlenmiştir. Diğer taraftan diyabette baskılanan Iss ve Ito akımlarının sodyum tungstat tedavisi uygulanan diyabetik sıçan kardiyomiyositlerinde anlamlı biçimde düzeldiği gözlenmiştir. Sodyum tungstat verilen kontrol grubu deneklerin ventrikül miyositlerinde ise Iss ve Ito akımlarında belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir.

4.3.2. L-tipi Ca^{2+} Akımları

L-tipi Ca^{2+} kanalları AP'nin şeklini etkilemenin yanında, SR membranında bulunan RYR reseptörlerinden sitozole Ca^{2+} salımını tetikleyerek uyarılma-kasılma çiftlenimini düzenleyen primer hücrel mekanizmaların başında gelir. Bu nedenle, kontrol ve diyabetli sıçan ventrikül miyositlerinden Ca^{2+} akımları kaydedilerek yoğunlukları ölçülmüştür. Bu akımların değerlendirilmesinden elde edilen ortalama akım yoğunluğunun zar potansiyeline göre değişim eğrileri ve gruplara ait örnek akım kayıtları Şekil 4.3'de görülmektedir. Sonuçlara bakıldığında, ilginç şekilde Kon ve DM gruplarının akım yoğunlukları (DM: -8.39 ± 0.48 pA/pF; Kon: -9.15 ± 0.77 pA/pF) arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir.

Sodyum tungstat tedavisi uygulanan DM-Tg ve Kon-Tg gruplarında L-tipi Ca^{2+} akım yoğunlukları bakımından bir değişiklik gözlenmemiştir (DM-Tg: -8.39 ± 0.56 pA/pF; Kon-Tg: -7.50 ± 0.69 pA/pF).



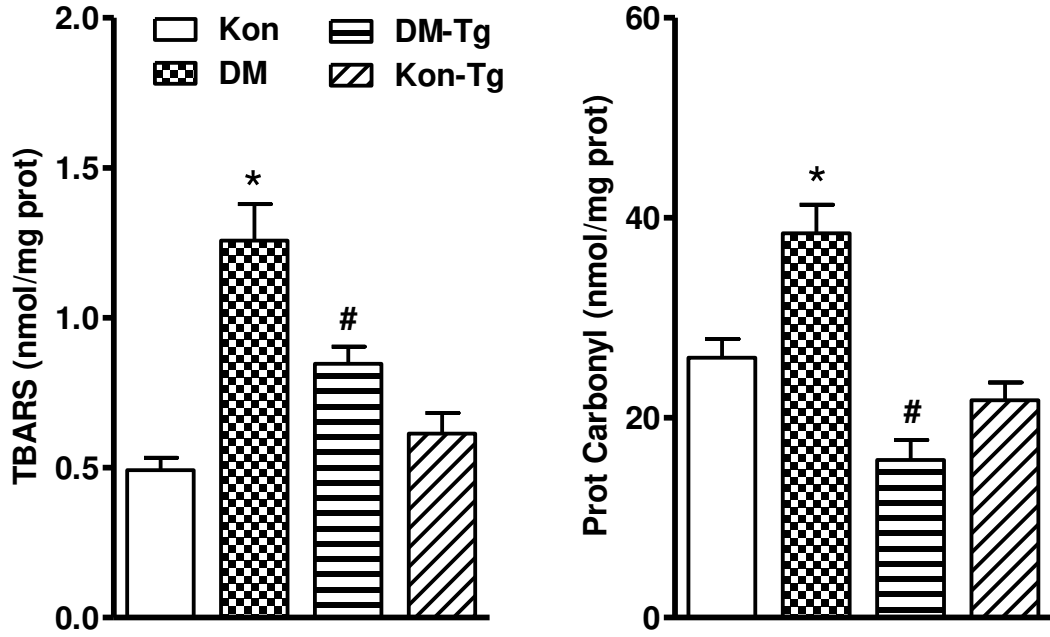
Şekil 4. 3. Gruplara ait ventrikül hücrelerinden kaydedilen ortalama I_{CaL} akım yoğunluklarının potansiyel değerlerine göre değişimi ve örnek akım kayıtları. Akımlar -50 ile +70 mV arasında 10 mV'luk adımlar şeklinde artan 300 ms süreli test pulsarı uygulanarak elde edilmiştir. Değerler, ortalama $\pm$ SEM olarak verilmişlerdir (n=13-17).

4.4. Biyokimyasal Parametreler

4.4.1. TBARS ve Protein Karbonil İçeriği

Oksidatif stres parametrelerinin kalbin fonksiyonel değişiklikleriyle ilişkili olup olmadığını belirlemek için kalp dokusunun protein karbonil içeriği ve TBARS düzeyi ölçülmüştür. STZ-indüklü diyabetik sıçanların kalplerinde TBARS düzeyi kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı biçimde artmıştır. Tungstat tedavisi uygulanan diyabetli sıçanların doku TBARS düzeyinin ise DM grubu değerleriyle karşılaştırıldığında anlamlı biçimde azaldığı tespit edilmiştir.

Bununla paralel olarak, DM grubundaki protein karbonil içeriği kontrol değerlerine kıyasla anlamlı bir şekilde artmış ve uzun süreli sodyum tungstat tedavisi sonrası DM-Tg grubunda DM grubuna göre anlamlı biçimde azalmıştır (Şekil 4.4). Buna karşılık normal sıçanlara 6 hafta boyunca sodyum tungstat verilen Kon-Tg grubunda Kon grubu değerlerine göre dikkate değer bir değişiklik olmadığı görülmüştür.

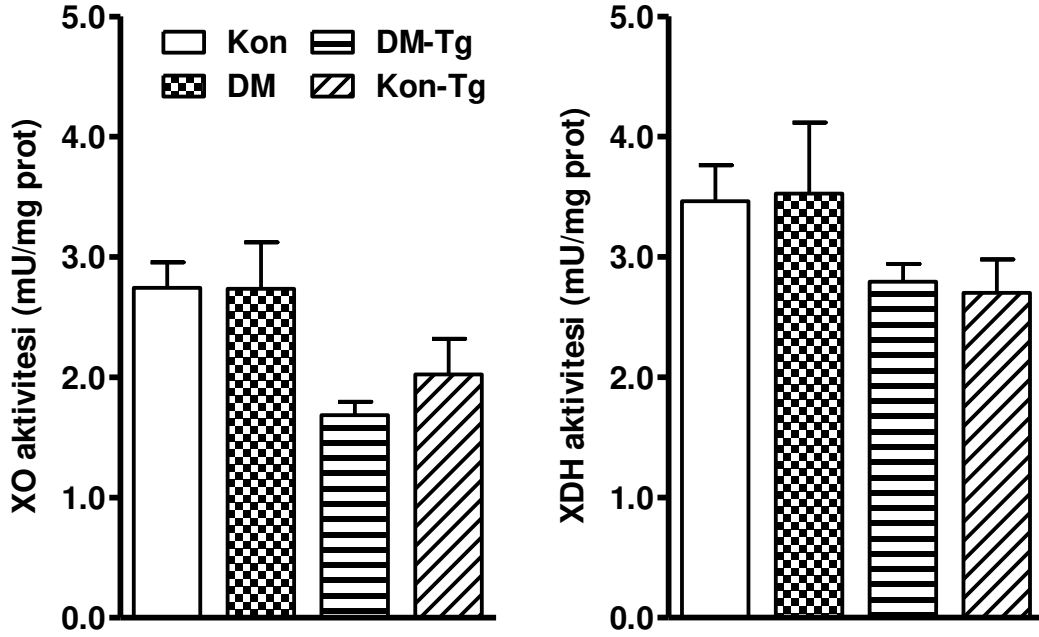


Şekil 4. 4. Kalp dokusunda ölçülen gruplara ait TBARS değerleri ve protein karbonil düzeyi. Değerler, ortalama±SEM olarak verilmişlerdir. Kon (n=8), DM (n=8), DM-Tg (n=7) and Kon-Tg (n=9). *p<0.05 vs. Kon grubu, #p<0.05 vs. DM grubu.

4.4.2. XO ve XDH Aktivitesi

Bu çalışmada süperoksit radikal oluşum yollarından biri olan ksantin oksidaz ve ksantin dehidrogenaz enzimlerinin aktiviteleri ölçülmüştür (Şekil 4.5). Altı haftalık deney süresinin sonunda yapılan ölçümlerde Kon ve DM grupları arasında XO ve XDH enzimlerinin aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bununla birlikte, tungstat tedavisinin uygulandığı diyabet ve kontrol gruplarındaki sıçan kalplerinde XO ve XDH aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşamamasına rağmen tungstatın varsayılan inhibitör etkisine

paralel olarak dikkat çekici bir düşüş gözlenmiştir.



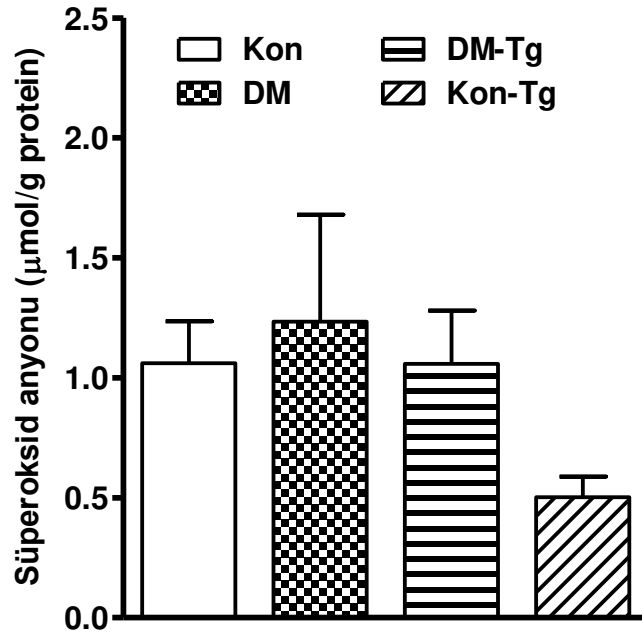
Şekil 4. 5. Kalp dokusunda ölçülen gruplara ait ksantin oksidaz ve ksantin dehidrogenaz enzim aktiviteleri. Değerler, ortalama±SEM olarak verilmişlerdir. Kon (n=8), DM (n=8), DM-Tg (n=7) and Kon-Tg (n=9).

4.4.3. Süperoksid Anyonu Salınımı

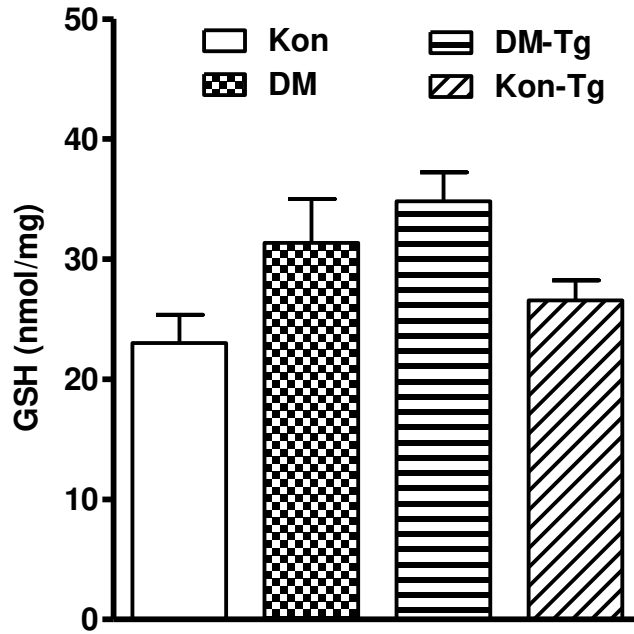
İzole edilen kardiyomiyositlerden spektrofotometrik olarak süperoksid anyonu salınımı ölçülmüştür. Süperoksid anyonu salınımı Kon-Tg grubunda Kon grubuna göre azalmış olsa da, istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmemiştir. Gruplara arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına karşın Kon grubuna göre diyabette bir miktar artış gösteren süperoksid salınımı DM-Tg grubunda da diyabetli gruba göre azalma eğilimi göstermiştir (Şekil 4.6).

4.4.4. Glutatyon (GSH)

Çalışmamız kapsamında deney gruplarının kalp dokusu örneklerinde GSH miktarı ölçümü de yapılmıştır. Ölçülen GSH miktarları bakımından diyabet gruplarında kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamakla birlikte, bir artış olduğu görülmüştür. Sodyum tungstat verilen grupta da GSH miktarının DM grubu değerleriyle benzerlik gösterdiği gözlenmiştir. Fakat sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4. 6. İzole edilen kardiomyositlerden ölçülen süperoksit anyon salınımı miktarı. Değerler, ortalama±SEM olarak verilmişlerdir. Kon (n=9), DM (n=8), DM-Tg (n=8) ve Kon-Tg (n=7).



Şekil 4. 7. Gruplara ait kalp dokusu örneklerinde ölçülen GSH miktarları. Değerler, ortalama±SEM olarak verilmişlerdir. Kon (n=8), DM (n=8), DM-Tg (n=7) ve Kon-Tg (n=9).

TARTIŞMA

Dünyada çok yaygın olarak görülen diyabet hastalığının daha önceki birçok çalışmada kalbin mekanik ve elektriksel aktivitesini bozarak kalp kasının kasılma ve gevşeme hızını azalttığı, iyonik mekanizmasını bozduğu ifade edilmiştir. Bu nedenle, diyabeti ve neden olduğu ölümcül komplikasyonlardan biri olan kalp yetmezliğini etkili şekilde önleyecek tedaviye yönelik stratejiler geliştirmek büyük bir önem teşkil etmektedir. Bu bilgilerimizin ışığı altında yapmış olduğumuz çalışmamızda kalbin mekanik ve elektriksel aktivitelerinde diyabetin yol açtığı bozukluklarda sodyum tungstat tedavisinin rolü araştırılmıştır. Çalışmamızda STZ enjeksiyonunun sıçanların vücut ağırlığının yanında kalp ağırlığının da azalmasına yol açtığı ve tungstat uygulamasının bu değişiklikleri düzeltmediği gözlemlenmiştir. Aynı şekilde diyabetik sıçanlarda hiperglisemi ile birlikte insülin düzeyinin azalma gösterdiği ve 6 haftalık sodyum tungstat tedavisinin bu parametreler üzerinde değişiklik yaratmadığı tespit edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda sodyum tungstat uygulanan diyabetik modellerde plazma insülin düzeyi ve/veya aktivitesinin arttığı ve bu yolla gliseminin normalize olduğu, bunun sonucunda da diyabete bağlı anormalliklerin düzeldiği rapor edilmiştir (43, 44, 136, 137). Bizim deneysel modelimizde ise sodyum tungstatın insülin düzeyi ve aktivitesi üzerinde düzeltici bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bulgular arasındaki bu çelişki büyük oranda uygulanan dozlar arasındaki farklardan kaynaklanıyor olabilir. Çünkü çalışmamızda sıçanlara günlük 100 mg/kg sodyum tungstat uygulamamıza karşın, literatürde yer alan diğer çalışmalarda deneklere verilen dozun günlük 200 ile 500 mg/kg arasında değişen oldukça yüksek seviyelerde olduğu görülmektedir (41, 42, 43, 44, 137, 138). Ancak son zamanlarda yapılan deneysel çalışmalarda bu düzeydeki sodyum tungstat tedavisinin sıçanlarda nöral ve sistemik yan etkiler oluşturabilecek toksik bir doz olduğu gösterilmiş olduğundan (139, 140), çalışmamızda özellikle daha düşük olan bu doz tercih edilmiştir. Bunun yanında bizim çalışmamızdan farklı olarak diğer çalışmalarda diyabetik hayvanlara sodyum tungstatın içme suyuyla verildiği dikkati çekmektedir (41, 42, 43, 44, 137, 138). Bu durum hiperglisemi nedeniyle sıçanların su tüketimlerinin kontrollere göre farklı olmasından dolayı, sonuçların karşılaştırılmasını güçleştirecek düzeyde farklı dozlara maruz kalmasına yol açmaktadır. Çalışmamızda tungstat gavaj iğnesi yoluyla doğrudan mideye verilmiş olduğundan doz konusundaki sonuçların değerlendirmesini güçleştirecek olası sorunlar büyük oranda giderilmiştir. Literatürdeki bulgular arasındaki farklar kısmen uygulama süresiyle de ilişkili olabilir (41, 42, 43, 44, 137, 138).

Diyabetik kardiyomiyopatinin etiyolojisi oldukça karmaşık olmakla birlikte ventriküler fonksiyon bozukluğunun yanında iyonik homeostazisi ve hücre içi

Ca^{+2} 'deki değişiklikleri kontrol eden çeşitli iyon kanallarındaki bozuklukların bu hastalığın gelişimindeki rolü ayrıntılı bir şekilde tanımlanmıştır (9, 15, 65, 66, 69). Diyabetik kardiyomiyositlerde kasılmanın azaldığını, Ca^{+2} transientlerinin genliklerinin azaldığını ve kinetiklerinin yavaşladığını gösteren bulgularımız önceki bulguları teyid etmektedir. Sodyum tungstat tedavisi diyabetik sıçanlarda, sarkomer kısalmasına ait traselerin uzayan kasılma ve relaksasyon zamanlarını (TP ve RT_{75}) düzeltmemesine karşın, anlamlı derecede baskılanan fraksiyonel kısalma genliğini ve Ca^{+2} tranzienti genliklerini arttırmıştır. Bu sonuçlar temelinde sodyum tungstatın diyabette gerçekleşen negatif lusitropik etkiyi düzeltmemesine karşın, diyabet indüklü kontraksiyon bozukluklarına düzeltici etkide bulunabileceği gözlenmiştir. Buna ek olarak, hücre içi Ca^{+2} regülasyonundaki değişiklikler ile kasılma parametreleri arasında paralellik olması, diyabetik kardiyomiyopatide gözlediğimiz fonksiyonel anormalliklerin hücre içi Ca^{+2} regülasyonunun bozulmasından kaynaklandığını kanıtlamaktadır. Dolayısıyla hücre içi Ca^{+2} regülasyonunda önemli rolü olan L tipi Ca^{+2} akımları da çalışmamız kapsamında incelenmiş, fakat hem diyabetik hem de tungstat tedavisi uygulanan diyabetik gruplardaki kardiyomiyositlerde L tipi Ca^{+2} akımlarının değişiklik göstermediği gözlenmiştir. Bu durum diyabette ortaya çıkan hücre içi Ca^{+2} değişikliklerinin kanal akımları yoluyla hücre içine giren iyon miktarından kaynaklanmadığını, bunun yerine L tipi kanal ile RYR reseptörü kenetlenmesindeki bir bozukluğa bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Kanal-reseptör kenetlenmesindeki değişiklik düşük bir amplifikasyona yol açabileceğinden, kanaldan aynı miktardaki Ca^{+2} girişine karşılık diyabetli kardiyomiyositlerde SR'dan daha az Ca^{+2} salınmasına yol açacaktır. Bunun dışında sitozolik Ca^{+2} düzeylerini kontrol eden NCX, SERCA, RYR gibi Ca^{+2} salınım ve geri-alım mekanizmalarındaki değişikliklerin de diyabette gerçekleşen karakteristik Ca^{+2} tranziientlerindeki bozukluklarla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (141, 142).

Nagareddy ve ark. (44) perfüze sıçan kalplerinde yaptıkları deneylerde uzun süreli tungstat tedavisinin bizim bulgularımızdan farklı olarak kasılma genliklerinin yanı sıra zamansal parametreleri de düzelttiğini göstermişlerdir. Bu farkın oluşmasının sebebi uygulanan sodyum tungstat konsantrasyonunun yüksek olması ve çalışılan preparat tipleri (kalp vs. hücre) olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla çalışmamız kapsamındaki deneylerin farklı sodyum tungstat dozlarında yapılması bu durumu daha kesin bir şekilde ortaya koyabilecektir.

Yapılan çalışmalarla birlikte gittikçe artan kanıtlar diyabetik ventrikül myositlerinde azalan K^{+} akımı ve buna bağlı olarak uzayan aksiyon potansiyelinin diyabetik hastalardaki aritmi riskini arttırdığına işaret etmektedir (9, 66, 69, 134, 143). Nitekim çalışmamızda da diyabetik kardiyomiyositlerde Ito ve Iss akımlarının baskılandığı, sodyum tungstatın ise muhtemel antioksidan etkisi ile bu akımları anlamlı şekilde düzelttiği gözlenmiştir. Çünkü diyabette ortaya çıkan hipergliseminin

ROS ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) salınımını tetiklediği bilinmektedir (5, 16, 144). Diyabette artan bu ROS ve RNS ürünlerinin, hücre içi ve plazma membrani iyon kanallarının ve taşıyıcılarının fonksiyonlarında anahtar role sahip olan amino asitlerin özelliklerini redoks modifikasyonları yoluyla değiştirebileceği ve böylece hücre içi Ca^{+2} regülasyonunu ve K^{+} kanallarını modüle edebileceği düşünülmektedir (16, 143, 144, 145). Özellikle sistein ve methionin oksidatif saldırıya daha hassas olduklarından protein oksidasyonu sülfidril gruplarının yapılarının değişmesine ve disülfid yapıların oluşmasına yol açmaktadır (134, 146). Bu türden yan zincirler proteinin aktivasyon ve inaktivasyonunu tetikleyen farklı moleküler durumlarda bulunabilmekte ve Ito gibi K^{+} kanallarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (15, 143). Dolayısıyla sodyum tungstatın, kanal proteinlerinin okside olmuş gruplarını indirgeyerek diyabetik miyositlerde değişmiş olan K^{+} akımlarını düzelttiği düşünülmektedir.

Fizyolojik koşullarda potansiyel ROS kaynağının mitokondrial elektron transport zinciri olmasına karşın XO, NOS ve NAD(P)H oksidaz gibi mitokondrial olmayan enzimatik kaynakların da diyabette ROS üretimini arttırdığı iddia edilmektedir (5, 145). Bu enzimlerden kaynaklanan ROS ürünleri (superoksit ve hidroksil radikalleri) bütün biyomolekül tiplerini etkileyebilmekte ve DNA, lipid ve proteinlerde oksidatif hasarlara yol açabilmektedir (146). Mevcut çalışmamızda diyabetik kalplerde oluşan oksidatif stres derecesini değerlendirebilmek için TBARS ve ROS bağımlı protein hasarlarının tespitinde yaygın olarak kullanılan protein karbonil miktarı ölçülmüştür. Mevcut veriler ışığında sodyum tungstat tedavisi, diyabetik kardiyomiyositlerin Ca^{+2} regülasyonunu ve iyon kanallarını düzenleyen biyomoleküllerde oksidatif hasarı tetikleyebilen hipergliseminin sebep olduğu protein ve lipid oksidasyonunu belirgin bir şekilde azaltmıştır. Tungstatın bu düzeltici etkisini antioksidan aktivitesi yoluyla gösterdiği düşünülmektedir (44, 147). Daha önce tip 1 diyabette arttığı gösterilen, superoksit radikal oluşum mekanizmalarından biri olan XO/XDH aktivitesi de diyabetik kalplerde ölçülmüştür (148). Desco ve ark., (148) XO ve XDH enzimlerinin en çok eksprese oldukları doku olan karaciğerde diyabetle birlikte belirgin bir şekilde arttığını bildirmiştir. Ancak yaptığımız ölçümler sonucunda ilginç bir şekilde kalpte diyabete bağlı olarak XO ve XDH aktivitelerinin değişmediği gözlenmiş, böylelikle diyabette önemli ölçüde arttığı tespit edilen oksidatif stresin başka mekanizmalardan kaynaklandığı kanaatine ulaşılmıştır. Bununla birlikte sodyum tungstat uygulandığı gruplarda XO/XDH aktivitesinde anlamlı bir seviyeye ulaşmasa da belirgin bir düşüş sağlamıştır. Bu bulgular da iddia edildiği şekilde tungstatın XO inhibisyonu yaptığını teyid etmektedir (46). Özetle sodyum tungstatın, diyabette serbest radikal oluşumunu tetikleyen ve oksidatif stres artışını indükleyen mekanizmalardan sadece XO/XDH yolunu değil, NOS ve NAD(P)H oksidaz gibi diğer yolları da inhibe edebileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak sodyum tungstat, glisemi normalizasyonu olmaksızın diyabetik kardiyomiyositlerde bozulan kontraktiliteyi düzeltmiştir. Bu etkiyi bozulan Ca^{+2} regülasyonunu ve baskılanan iyonik akımları düzelterek gerçekleştirdiği görülmüştür. İnsülin ve glikoz düzeylerinde bir iyileşme saptanamamış olması nedeniyle sodyum tungstatın antidiyabetik ya da insülin-mimetik etkisinin olmadığı kanısına varılmıştır. Diğer taraftan diyabetik sıçan kalbinde artan oksidatif stres göstergelerinin tungstat tedavisiyle ciddi şekilde azaldığı göz önüne alınırsa, bu yararlı etkisini öncelikli olarak antioksidan aktivitesiyle başardığı düşünülmektedir. Özetle çalışmamızın bulguları, diyabetik hastalarda artan aritmi eğiliminin ve kardiyak yetmezliğin önlenmesinde sodyum tungstatın terapötik potansiyele sahip olabileceğini ortaya koymaktadır. Ancak sodyum tungstatın uyarılma-kasılma çiftlenimindeki rolünün daha iyi anlaşılabilmesi için ileriki çalışmalarda RYR, NCX, SERCA gibi Ca^{+2} regülasyonunda görev alan proteinlerin aktivite ve ekspresyonlarının araştırılması gerekmektedir.

SONUÇLAR

Bu çalışmada, diyabete bağlı komplikasyonları düzeltebileceği düşünülen sodyum tungstat tedavisinin, bu hastalıkta gelişen kasılma, hücre içi Ca^{+2} regülasyonu, Ca^{+2} ve K^{+} akımları ve oksidatif stres aktivitesindeki değişikliklere etkisi araştırılmıştır. Bunun için, kalbin elektriksel ve mekanik aktivitelerinin yanında, hücre içi iyon değişimleri ve oksidatif stres parametreleri ölçülmüştür.

Bu çalışmamızda STZ enjeksiyondan sonra diyabetik sıçanların vücut ağırlığının yanında kalp ağırlığının da azalmasına sebep olduğu ve 6 haftalık sodyum tungstat uygulamasının değişiklik yaratmadığı gözlenmiştir. Aynı şekilde diyabetik sıçanlarda yüksek kan glikozuna paralel olarak insülin düzeyinin azaldığı ölçülmüş ve sodyum tungstat tedavisinin bu parametreleri düzeltmediği gözlenmiştir.

Bulgularımız ışığında diyabetik kardiyomiyositlerde baskılanan Ito ve Iss akımlarının, sodyum tungstatın muhtemel antioksidan etkisi ile anlamlı biçimde düzeldiği gözlenmiştir.

Sodyum tungstat tedavisi uygulanan diyabetik gruplarda diyabet grubuna göre sarkomer kısalması ve Ca^{+2} tranzienti genliklerinin anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir.

Diyabetik gruplarda artan TBARS ve protein karbonil miktarının, 6 haftalık tungstat tedavisiyle DM-Tg gruplarında anlamlı biçimde azaldığı gözlenmiştir.

Kontrol gruplarına göre diyabetik kalplerdeki XO/XDH aktivitelerinde değişiklik olmadığı, tungstat tedavisi sonucunda bu enzimlerin aktivitelerinde belirgin bir azalma olduğu, fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşmadığı gözlenmiştir.

Ölçülen speroksit anyon salınımı ve GSH miktarları bakımından gruplar arasında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

KAYNAKLAR

1. STANLEY WC., LOPASCHUK GD, MCCORMACK JG. Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovasc Res.* 34(1):25-33, 1997.
2. MAHGOUB MA., ABD-ELFATTAH AS. Diabetes mellitus and cardiac function. *Mol Cell Biochem.* 180(1-2):59-64 1998.
3. OZDEMIR S. Anjiyotensin II Reseptörünün Deneysel Diyabetik Sıçan Kalbi Elektriksel Aktivitesindeki Rolü [Doktora Tezi]. Ankara: Ankara Üniversitesi; 2004.
4. HEIDARI Z., MAHMOUDZADEH-SAGHEB H., MOUDI B. A quantitative study of sodium tungstate protective effect on pancreatic beta cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *Micron.* 39(8):1300-5, 2008.
5. BOUDINA S., ABEL ED Diabetic cardiomyopathy revisited *Circulation.* 26;115(25): 3213-23, 2007.
6. KHAVANI K., KHAVANDI A., ASGHAR O., GREENSTEIN A., WITHERS S., HEAGERTY AM., MALİK RA. Diabetic cardiomyopathy--a distinct disease? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 23(3):347-60, 2009.
7. FEIN F., KORNSTEIN L., STROBECK J., CAPASSO J., AND SONNENBLICK E. Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circ Res.* 47: 922-933, 1980.
8. ISHIKAWA T., KAJIWARA H., AND KURIHARA S. Alterations in contractile properties and Ca²⁺ handling in streptozotocin-induced diabetic rat myocardium. *Am J Physiol.* 277: H2185-2194, 1999.
9. OZDEMIR S., UGUR M., GÜRDAL H., AND TURAN B. Treatment with AT(1) receptor blocker restores diabetes-induced alterations in intracellular Ca(2+) transients and contractile function of rat myocardium. *Arch Biochem Biophys.* 435: 166-174, 2005.
10. REN J., WALSH M., HAMATY M., SOWERS J., AND BROWN R. Augmentation of the inotropic response to insulin in diabetic rat hearts. *Life Sci.* 65: 369-380, 1999.
11. TROST S., BELKE D., BLUHM W., MEYER M., SWANSON E., AND DILLMANN W. Overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase improves myocardial contractility in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes.* 51: 1166-1171, 2002.
12. TUNCAY E., SEYMEN A., TANRIVERDI E., YARAS N., TANDOĞAN B., ULUSU N., AND TURAN B. Gender related differential effects of Omega-3E treatment on diabetes-induced left ventricular dysfunction. *Mol Cell Biochem* 304: 255-263, 2007.

13. TAHILIANI AG., MCNEILL JH Diabetes-induced abnormalities in the Myocardium *Life Sci.* 17;38(11):959-74, 1986.
14. YU JZ., RODRIGUES B., MCNEILL JH. Intracellular calcium levels are unchanged in the diabetic heart. *Cardiovasc Res.* 34(1):91-8, 1997 Apr.
15. CESARIO DA., BRAR R., SHIVKUMAR K. Alterations in ion channel physiology in diabetic cardiomyopathy. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 35(3):601-10, 2006.
16. DHALLA N., LIU X., PANAGIA V., AND TAKEDA N. Subcellular remodeling and heart dysfunction in chronic diabetes. *Cardiovasc Res.* 40: 239-247, 1998.
17. CHOI K., ZHONG Y., HOIT B., GRUPP I., HAHN H., DILLY K., GUATIMOSIM S., LEDERER W., AND MATLIB M. Defective intracellular Ca(2+) signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283: H1398-1408, 2002.
18. HATTORI Y., MATSUDA N., KIMURA J., ISHITANI T., TAMADA A., GANDO S., KEMMOTSU O., AND KANNO M. Diminished function and expression of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger in diabetic rats: implication in Ca²⁺ overload. *J Physiol* 527 Pt 1: 85-94, 2000.
19. NORBY F., WOLD L., DUAN J., HINTZ K., AND REN J. IGF-I attenuates diabetes-induced cardiac contractile dysfunction in ventricular myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E658-666, 2002.
20. TESHIMA Y., TAKAHASHI N., SAIKAWA T., HARA M., YASUNAGA S., HIDAKA S., AND SAKATA T. Diminished expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and ryanodine sensitive Ca(2+) Channel mRNA in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 32: 655-664, 2000.
21. NORBY F., ABERLE NN., KAJSTURA J., ANVERSA P., REN J. Transgenic overexpression of insulin-like growth factor I prevents streptozotocin-induced cardiac contractile dysfunction and beta-adrenergic response in ventricular myocytes. *J Endocrinol* 180: 175-182, 2004.
22. YARAS N., UGUR M., OZDEMIR S., GURDAL H., PURALI N., LACAMPAGNE A., VASSORT G., AND TURAN B. Effects of diabetes on ryanodine receptor Ca release channel (RyR2) and Ca²⁺ homeostasis in rat heart. *Diabetes.* 54: 3082-3088, 2005.
23. LAGADIC-GOSSMANN D., BUCKLER K., LE PRIGENT K., FEUVRAY D. Altered Ca²⁺ handling in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *Am J Physiol* 270: H1529-1537, 1996.
24. HAYASHI H., NODA N. Cytosolic Ca²⁺ concentration decreases in diabetic rat myocytes. *Cardiovasc Res* 34: 99-103, 1997.
25. NODA N., HAYASHI H., MIYATA H., SUZUKI S., KOBAYASHI A., YAMAZAKI N. Cytosolic Ca²⁺ concentration and pH of diabetic rat myocytes during metabolic inhibition. *J Mol Cell Cardiol.* 24(4):435-46, 1992.
26. YU Z., TIBBITS GF., MCNEILL JH. Cellular functions of diabetic cardiomyocytes:

contractility, rapid-cooling contracture, and ryanodine binding. *Am J Physiol.* 266(5 Pt 2):H2082-9, 1994.

27. DHALLA NS., TEMSAH RM., NETTICADAN T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.* 18(6):655-73, 2000.
28. FIOLET JW., BAARTSCHEER A., SCHUMACHER CA., CORONEL R., TER WELLE HF. The change of the free energy of ATP hydrolysis during global ischemia and anoxia in the rat heart. Its possible role in the regulation of transsarcolemmal sodium and potassium gradients. *J Mol Cell Cardiol.* 16: 1023-1036, 1984.
29. VAN ECHTELD CJ., KIRKELS JH., EIJGELSHOVEN MH., VAN DER MP., RUIGROK TJ. Intracellular sodium during ischemia and calcium-free perfusion: a ²³Na NMR study. *J Mol Cell Cardiol.* 23: 297-307, 1991.
30. MARBAN E., KORETSUNE Y., CORRETTI M., CHACKO VP., KUSUOKA H. Calcium and its role in myocardial cell injury during ischemia and reperfusion. *Circulation.* 80:IV17-IV22, 1989.
31. YOSHIDA K., MATOBA R., FUJITANI N., ONISHI S. Effect of sulfhydryl group modification on age-associated alteration of actomyosin ATPase activity in human myocardium. *Basic Res Cardiol.* 85: 2-8, 1990.
32. PAOLISSO G., D'AMORE A., GIUGLIANO D., CERIELLO A., VARRICCHIO M., D'ONOFRIO F. Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetic patients. *Am J Clin Nutr.* 57: 650-656, 1993.
33. GIUGLIANO D., CERIELLO A., PAOLISSO G. Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? *Metabolism.* 44: 363-368, 1995.
34. WOHAIEB SA., GODIN DV. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes.* 36: 1014-1018, 1987.
35. KAUL N., SIVESKI-ILISKOVIC N., THOMAS TP., HILL M., KHAPER N., SINGAL PK. Probucol improves antioxidant activity and modulates development of diabetic cardiomyopathy. *Nutrition.* 11: 551-554, 1995.
36. GAO LH., LIU WP., WANG BL., LI L., XIE MJ., LI YR., ET AL. Effects of bis(alpha-furancarboxylato)oxovanadium(IV) on non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats. *Clin Chim Acta.* 368(1-2):173-8, 2006.
37. TRUMBO PR., ELLWOOD KC. Chromium picolinate intake and risk of type 2 diabetes: an evidence-based review by the United States Food and Drug Administration. *Nutr Rev.* 64(8):357-63, 2006.
38. OZCELIKAY AT., BECKER DJ., ONGEMBA LN., POTTIER AM., HENQUIN JC., BRICHARD SM. Improvement of glucose and lipid metabolism in diabetic rats treated with molybdate. *Am J Physiol.* 270(2 Pt 1): E344-52, 1996.
39. VASUDEVAN H., MCNEILL JH. Chronic cobalt treatment decreases hyperglycemia

in streptozotocin-diabetic rats. *Biometals*. 20(2): 129-34, 2007.

40. PARTIDA-HERNANDEZ G., ARREOLA F., FENTON B., CABEZA M., ROMAN-RAMOS R., REVILLA-MONSALVE MC. Effect of zinc replacement on lipids and lipoproteins in type 2-diabetic patients. *Biomed Pharmacother*. 60(4):161-8, 2006.
41. BARBERA A., RODRIGUEZ-GIL JE., GUINOVART JJ. Insulin-like actions of tungstate in diabetic rats. Normalization of hepatic glucose metabolism. *J Biol Chem*. 269(31):20047-53, 1994.
42. BARBERA A., FERNANDEZ-ALVAREZ J., TRUC A., GOMIS R., GUINOVART JJ. Effects of tungstate in neonatally streptozotocin-induced diabetic rats: mechanism leading to normalization of glycaemia. *Diabetologia*. 40(2): 143-9, 1997
43. BARBERA A., GOMIS RR., PRATS N., RODRIGUEZ-GIL JE., DOMINGO M., GOMIS R. Tungstate is an effective antidiabetic agent in streptozotocin-induced diabetic rats: a long-term study. *Diabetologia*. 44(4): 507-13, 2001
44. NAGAREDDY PR., VASUDEVAN H., MCNEILL JH. Oral administration of sodium tungstate improves cardiac performance in streptozotocin-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 83(5):405-11, 2005.
45. MATSUBARA., T., MUSAT-MARCU S., MISRA H.P., AND DHALLA., N.S. Protective effect of vanadate on oxyradical-induced changes in isolated perfused heart. *Mol Cell Biochem*. 153: 79–85, 1995.
46. DOMINGO JL. Vanadium and diabetes What about vanadium toxicity? *Mol Cell Biochem*. 203: 185-187, 2000.
47. DOMINGO JL., GOMEZ M., SANCHEZ DJ., LLOBET JM., KEEN CL. Toxicology of vanadium compounds in diabetic rats:the action of chelating agents on vanadium accumulation. *Mol Cell Biochem*. 153:233-240, 1995.
48. DOMINGO JL., GOMEZ M., LLOBET JM., CORBELLA J., KEEN CL Oral vanadium administration to streptozotocin-diabetic rats has marked negative side effects, which are independent of the form of vanadium used. *Toxicology*. 66: 279-287, 1991.
49. VANDER A.J., SHERMAN J.H., LUCIANO D.S. Human physiology: The mechanism of body function. McGraw Hill. Inc, International Edition., 1994.
50. WAHLER G.M., Cardiac action potentials. In: *Cell Physiology*, Ed.: N. Sperelakis. New York, Academic Press. pp 780-790, 1997.
51. MUKHERJEE R., SPINALE F.G. Alterations in ionic currents and relation to contractile dysfunction with severe cardiac hypertrophy and failure. *Heart Fail Rev*. 4: 319–327, 1999.
52. JANVIER N.C., BOYETT M.R. The role of Na-Ca exchange current in the cardiac action potential. *Cardiovasc Res*. 32: 69-84 1996.
53. BRACKEN N.K., SINGH J., WINLOW W., HOWARTH F.C. Mechanisms underlying contractile dysfunction in streptozotocin-induced type 1 and type 2 diabetic

cardiomyopathy. In: *Artherosclerosis, hypertension and diabetes*, Ed.: G.N. Pierce, M. Nagano, P. Zahradka, N.S. Dhalla. Boston: Kluwer Academic Publishers. p: 386-407, 2003.

54. BERS D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 415: 198-204 2002.
55. STANLEY W.C., LOPASCHUK G.D., MCCORMACK J.G. Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovasc Res*. 34(1): 25-33 1997.
56. MAHGOUB M.A., ABD-ELFATTAH A.S. Diabetes mellitus and cardiac function. *Mol Cell Biochem*. 180: 59-64 1998.
57. AMOS A.F., MCCARTY D.J., ZIMMET P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diab. Med*. 14 Suppl. 5: S1-S85 1997.
58. DHALLA N.S., PIERCE G.N., INNES I.R., BEAMISH R.E. Pathogenesis of cardiac dysfunction in diabetes mellitus. *Can J Cardiol*. 1: 263-281, 1985.
59. YU J.Z., RODRIGUES B., MCNEIL J.H. Intracellular calcium levels are unchanged in the diabetic heart. *Cardiovasc. Res*. 34: 191-198, 1997.
60. SZKUDELSKI T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol. Res*. 50: 536-546, 2001.
61. FEIN F.S., SONNENBLICK E.H. Diabetic cardiomyopathy. *Prog. Cardiovasc. Dis*. 27(4): 255-70, 1985.
62. GALDERISI M., ANDERSON K.M., WILSON P.W., LEVY D. Echocardiographic evidence for the existence of a distinct diabetic cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 68(1): 85-9 1991.
63. FLACK J.M., HAMATY M., STAFFILENO B.A. Renin-angiotensin-aldosterone-kinin system influences on diabetic vascular disease and cardiomyopathy. *Miner Electrolyte Metab*. 24: 412-422, 1998.
64. FEIN F.S., KORNSTEIN L.B., STROBECK, J.E., CAPASSO, J.M., SONNENBLICK, E.H. Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circ Res*. 47(6): 922-33, 1980.
65. SHIMONI Y., FIREK L., SEVERSON D., GILES W. Short-term diabetes alters K⁺ currents in rat ventricular myocytes. *Circ Res*. 74(4): 620-8, 1994.
66. AYAZ M., OZDEMIR S., UGUR M., VASSORT G., TURAN B. Effects of selenium on altered mechanical and electrical cardiac activities of diabetic rat. *Arch Biochem Biophys*. 426: 83-90, 2004.
67. JOURDON P., FEUVRAY, D. Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *J Physiol*. 470: 411-429, 1993.
68. TSUCHIDA K., WATAJIMA H., OTOMO S. Calcium current in rat diabetic ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 267: H2280-H2289, 1994.

69. SHIMONI Y. Inhibition of the formation or action of angiotensin II reverses attenuated K⁺ currents in type 1 and type 2 diabetes. *J Physiol.* 537(1): 83-92, 2001.
70. ISHII H., KOYA D., KING G. L. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med.* 76: 21-31, 1998.
71. SHIMONI Y. Protein kinase C regulation of K⁺ currents in rat ventricular myocytes and its modification by hormonal status. *J Physiol.* 520(2): 439-449, 1999.
72. MALHOTRA A., BARINDER P.S.K., CHEUNG S., OPAWUMI D., MEGGS L.G. Angiotensin II promotes glucose-induced activation of cardiac protein kinase C isozymes and phosphorylation of troponin I. *Diabetes.* 50: 1918-1926 2001.
73. SERAFINI M., DEL RIO D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the Total Antioxidant Capacity the right tool? *Redox Rep.* 9(3): 145-52, 2004.
74. BABIOR BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 109(1): 33-44 2000.
75. EVANS JL., GOLDFINE ID., MADDUX BA., GRODSKY GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes.* Jan;52(1):1-8, 2003.
76. TOYOKUNI S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int.* 49: 91-102 1999.
77. FERRARI R., CECONI C., CURELLO S., CARGNONI A., PASINI E., DE GIULI F., ALBERTINI A. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr.* 53: 215-222 1991.
78. CHEESEMAN KH., SLATER TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 49: 481-493 1993.
79. KUSTERER K., PIHAN G., SZABO S. Role of lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by HCl, NaOH or ischemia. *Am J Physiol.* 252: 811-816 1987.
80. KUSTERER K., PIHAN G., SZABO S. Role of lipid peroxidation in gastric mucosal lesions induced by HCl, NaOH, or ischemia. *Am J Physiol.* 252: 811-816, 1987.
81. CHIH-CHING Y., MING-FENG H., SHIH-MENG T., SHU-KAI L., JEN-KUEI H., JUNG-CHIH H., LI-HSUAN W., SZU-HSIEN W., LINDA AH., HSU M., LI-YU T. Superoxide anion radical, lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer. *Clin Chim Acta.* 361: 104– 111, 2005.
82. STAHL W., SEIS H. Reactive oxygen species. *Research Monographs.* 1-2, 2002.
83. I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkiler. *Mimoza Yayınları, Konya.* ss: 85-91, 1995.
84. BETTERIDGE J. What is oxidative stress? *Metabolism.* 49:3-8, 2000.

85. YU BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 74: 139-162, 1994.
86. MCCORD JM., FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 244:6049-6055, 1969.
87. CURNATTE JT., AND BABIOR BM. Chronic granulomatous disease. *Adv Hum Genet.* 16: 229–297, 1987.
88. BABIOR BM., LAMBETH JD., NAUSEEF W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys.* 397: 342–344, 2002.
89. HARTZ JW., DEUTSCH HF. Subunit structure of human erythrocyte superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 247:7043-7050, 1972.
90. AUROMA OL., HALLIWELL B., GAJEWSKI E., DIZDAROGLU M. Copper ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J.* 273: 601-604, 1991.
91. SCHOENBERG MH., BEGER HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit. Care Med.* 21: 1376-1386, 1993.
92. PARK JL., LUCCHESI BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 689: 1905-12, 1999.
93. CALABRESE V., BATES TE., STELLA AM. NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res.* 25: 1315-1341, 2000.
94. BECKMAN JS., BECKMAN TW., CHEN J., MARSHALL PA., FREEMAN BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci.* 87: 1620–1624, 1990.
95. HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 11: 298-300, 1956.
96. DEAN RT., FU S., STOCKER R., DAVIES MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 324: 1-18, 1997.
97. FRAGA CG., SHIGENAGA MK., PARK JW., DEGAN P., AMES BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci.* 87: 4533-4537, 1990.
98. KANNAN K., JAIN SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology.* 7: 153–163, 2000.
99. KOSTER JF., BIEMOND P., STAM H. Lipid peroxidation myocardial ischaemic damage: cause or consequence? *Basic Res Cardiol.* 82: 253-60, 1987.
100. CLEMENS MR, WALLER HD. Lipid peroxidation in erythrocytes. *Chem Phys Lipids.* 45: 251-268, 1987.
101. GUTTERIDGE JM., HALLIWELL B. The measurement and mechanism of lipid

peroxidation in biological system. Trends Biochem Sci. 15: 129-35, 1990.

102. FRANK L., MASSARO D. Oxygen Toxicity. Am J Med. 69: 117-26, 1980.
103. GARNER MH., SPECTOR A. Selective oxidation of cystein and methionine in normal and senile cataractous lenses. Proc Natl Acad Sci USA. 77: 1274-1277, 1980.
104. WINYARD P., LUNEC J., BRAILSFORD S., BLAKE D. Action of free radical generating systems upon the biological and immunological properties of caeruloplasmin. Int J Biochem. 16: 1273-1278, 1984.
105. HALLIWELL B. Reactive oxygen species and the central nervous system. J Neurochem. 59: 1609–1623, 1992.
106. CAKATAY U., KAYALI R. The clinical importance of protein oxidation. Cerrahpaşa J Med. 35: 140-149, 2004.
107. GANONG WF: Section 3, Vision, pp: 287-354, Review of Medical Physiology, Ed. Ganong W. 1996.
108. SAGONE AL., GREENWALD J., KRAUT EH., BIANCHINE J., SING D. Glucose: a role as a free radical scavenger in biological systems. J Lab Clin Med. 101: 97-104, 1983.
109. HASSAN HM., FRIDOVICH L. Chemistry and biochemistry of superoxide dismutases. Eur J Rheumatol Inflamm. 4: 160-172, 1981.
110. KASAI H., NISHIMURA S., KUROKOWA Y., HAYASHI Y. Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ DNA. Carcinogenesis. 8: 1959-61, 1987.
111. PARKS DA., GRANGER DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. Acta Physio Scand Suppl. 548: 87-99, 1986.
112. HILLE R, NISHINO T. Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. FASEB J. 9(11): 995-1003, 1995.
113. AMAYA Y., YAMAZAKI K., SATO M., NODA K., NISHINO T., NISHINO T. Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. J Biol Chem. 265(24): 14170-14175, 1990.
114. HARRISON R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? Free Radic Biol Med. 15;33(6): 774-797, 2002.
115. PINNELL SR. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. J Am Acad Dermatol. 48: 1-19, 2003.
116. LAWRENCE RA., PARKHILL LK., BURK RF. Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency. J Nutr. 108: 981-987, 1978.

117. CORY S., ADAMS JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2: 647–56, 2002.
118. DALTON-BUNNOW MF. Review of sulfite sensitivity. *Am. J. Hosp. Pharm.* 42: 2220-2226, 1985.
119. LAVOIE JC., LANHANCE C., CHESSEX P. Antiperoxide activity of sodium metabisulfite. A double-edged sword. *Biochem Pharmacol*. 47: 871-876, 1994.
120. IGNEY FH., KRAMMER PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2: 277–88, 2002.
121. SCHIMMER AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res*. 15(64) : 7183-90, 2004.
122. GUNNISON F., PALMES ED. Persistence of plasma S-sulfonates following exposure of rabbits to sulfite and sulfur dioxide. *Toxicol Appl Pharmacol*. 24: 266-278, 1973.
123. SLEE EA., ADRAIN C., MARTIN SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*. 276: 7320–6, 2001.
124. SAKAHIRA H., ENARI M., NAGATA S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 391: 96–9, 1998.
125. ESTERBAUER H., CHEESEMON K. Determination of aldehydic lipid-peroxidation products malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 186:407-421, 1990.
126. WHITIN JC., BHAMRE S., THAM DM., COHEN HJ. Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 283: 20-8, 2002.
127. FREEMAN BA., CRAPO JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*. 47: 412-426, 1982.
128. CARLBERG I., MANNERVIK B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem*. 250:5475-5480, 1975.
129. DERIN N., YARGICOGLU P., ASLAN M., ELMAS O., AGAR A., AICIGUZEL Y. The effect of sulfite and chronic restraint stress on brain lipid peroxidation and anti-oxidant enzyme activities. *Toxicol Ind Health*. 22: 233-40, 2006.
130. JERNSTROM B., DOCK L., MARTINEZ M. Metabolic activation of benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide to protein-binding products and the inhibitory effect of glutathione and cysteine. *Carcinogenesis*. 5: 199-204, 1984.
131. AL-TURK WA., STOHS SJ., EL-RASHIDY FH., OTHMAN S., SHAHEEN O. Changes in glutathione reductase and glutathione-S-transferase as a function of cell concentration and age. *Pharmacology*. 34: 1-8, 1987.
132. OZDEMIR S., BITO V., HOLEMANS P., VINET L., MERCADIER JJ., VARRO A.,

- SIPIDO KR. Pharmacological inhibition of na/ca exchange results in increased cellular Ca²⁺ load attributable to the predominance of forward mode block. *Circ Res.* 102(11):1398-405, 2008.
133. XU Z., ROZANSKI G.J. Proton Inhibition of transient outward potassium current in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 29: 481–490, 1997.
 134. ROZANSKI GJ., XU Z. Sulfhydryl modulation of K⁺ channels in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 34: 1623-1632, 2002.
 135. GRYNKIEWICZ G., POENIE M., TSIEN R. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260: 3440-3450, 1985.
 136. BALLESTER J., MUÑOZ MC., DOMINGUEZ J., PALOMO MJ., RIVERA M., RIGAU T., GUINOVART J. J., RODRIGUEZ-GIL J. E. Tungstate administration improves the sexual and reproductive function in female rats with streptozotocin-induced diabetes. *Hum Reprod.* 22: 2128-2135, 2007.
 137. MUÑOZ MC., BARBERÀ A., DOMINGUEZ J., FERNÁNDEZ-ALVAREZ J., GOMIS R., GUINOVART J. J. Effects of tungstate, a new potential oral antidiabetic agent, in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes.* 50: 131-138, 2001.
 138. FIERABRACCI V., DE TATA V., POCAI A., NOVELLI M., BARBERÀ A., MASIELLO P. Oral tungstate treatment improves only transiently alteration of glucose metabolism in a new rat model of type 2 diabetes. *Endocrine.* 19: 177-184, 2002.
 139. MCINTURF SM., BEKKEDAL MY., WILFONG E., ARFSTEN D., CHAPMAN G., GUNASEKAR PG. The potential reproductive, neurobehavioral and systemic effects of soluble sodium tungstate exposure in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15;254(2):133-7, 2011.
 140. MCINTURF SM., BEKKEDAL MY., WILFONG E., ARFSTEN D., GUNASEKAR PG., CHAPMAN GD. Neurobehavioral effects of sodium tungstate exposure on rats and their progeny. *Neurotoxicol Teratol* 30, 455-461, 2008.
 141. LACOMBE V.A., VIATCHENKO-KARPINSKI S., TERENCEV D., SRIDHAR A., EMANI S., BONAGURA J.D., FELDMAN DS., GYÖRKE S., CARNES, CA. Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293: R1787-1797, 2007.
 142. SHAO C H., WEHRENS XH., WYATT TA., PARBHU S., ROZANSKI GJ., PATEL KP., BIDASEE KR. Exercise training during diabetes attenuates cardiac ryanodine receptor dysregulation. *J Appl Physiol.* 106: 1280-1292, 2009.
 143. LI X., XU Z., LI S., ROZANSKI GJ. Redox regulation of Ito remodeling in diabetic rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288: H1417-1424, 2005.

- 144.** BIDASEE KR., NALLANI K., BESCH HR., DINCER U. D. Streptozotocin-induced diabetes increases disulfide bond formation on cardiac ryanodine receptor (RyR2). *J Pharmacol Exp Ther.* 305: 989-998, 2003.
- 145.** AKKI A., ZHANG M., MURDOCH C., BREWER A., SHAH AM. NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function. *J Mol Cell Cardiol.* 47: 15-22, 2009.
- 146.** DALLE-DONNE I., GIUSTARINI D., COLOMBO R., ROSSI R., MILZANI A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 9: 169-176, 2003.
- 147.** NAKHAEI A., BOKAEIAN M., AKBARZADEH A., HASHEMI M. Sodium tungstate attenuate oxidative stress in brain tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Trace Elem Res.* 136: 221-231, 2010.
- 148.** DESCO MC., ASENSI M., MÁRQUEZ R., MARTÍNEZ-VALLS J., VENTO M., PALLARDÓ FV., SASTRE J., VIÑA J. Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes. *Diabetes.* 51(4):1118-24, 2002.

ÖZGEÇMİŞ

Mustafa AYDEMİR, 1983 yılında Isparta ilinin Eğirdir ilçesinde dünyaya geldi. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya’da tamamladı. 2000 yılında Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği (Almanca) bölümünde üniversite eğitime başladı. Lisans diplomasını 2008 yılında aldı ve 2009 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı. Yabancı dili İngilizce ve Almanca’dır.