T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OLEANDER'İN İZOLE SIÇAN KALP KASI PREPARATI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ELEKTROFİZYOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Nilüfer AKGÜN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Murat AYAZ

KONYA-2014

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OLEANDER'İN İZOLE SIÇAN KALP KASI PREPARATI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ELEKTROFİZYOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Nilüfer AKGÜN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Murat AYAZ

KONYA-2014

ÖNSÖZ

Günümüzde hızla değişen yaşam standartları sebebiyle insanları olumsuz yönde etkileyebilecek risk faktörleri de artış göstermektedir. Buna paralel olarak gelişmiş ve gelişmekte olan toplumların tümünde özellikle tip II diyabet prevelansı yükselmektedir.

2013 yılı itibariyle dünyadaki diyabetli nüfusunun 382 milyon, ülkemizde ise 7 milyona ulaştığı bilinmektedir (Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)).

Türkiye Cumhuriyeti, Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü tarafından 2011 – 2014 yılları arası için Türkiye Diyabet Önleme ve Kontrol Programı yürütülmektedir. Söz konusu programın yüksek lisans öğrenimim dönemine denk gelmesi bana ilham kaynağı olmuştur.

İnanıyorum ki; bilim insanlarının çalışmaları neticesinde diyabet insan sağlığını tehdit eden bir hastalık olmayacaktır.

Çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı başkanı Doç. Dr. Murat AYAZ başta olmak üzere, yüksek lisans hayatım boyunca benden maddi, manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve aştığım her engelde büyük payı olan yardımsever arkadaşım Ömer ÜNAL'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
1.GİRİŞ	1
1.1. Kalp Kası	1
1.2. Kalp Kası Hücre Zarı Yapısı ve Fonksiyonları	5
1.3. Kontraktil Proteinler	7
1.4. Kalp Kasındaki Elektriksel Olaylar	9
1.4.1. Ventrikül Aksiyon Potansiyeli	9
1.4.2. Ventriküler Aksiyon Potansiyelinde Rol Alan İyonik Akımlar	11
1.5. Kalp Kasında Kasılma Mekanizması	12
1.5.1. Kayan Filamentler Modeli	12
1.5.2. Kalp Kasının Mekanik Özellikleri	15
1.5.3. Uyarılma Kasılma Çiftlenimi	18
1.6. Diyabetes Mellitus	19
1.6.1. Sıçanlarda Deneysel Diyabet Modelleri	20
1.6.2. Deneysel Diyabetik Kardiyomiyopati	21
1.7. Nerium Oleander	23
1.7.1. Nerium Oleander'in Biyolojik Sistemlerdeki Önemi	24
1.7.2. Nerium Oleander ve Diyabetes Mellitus	27
2. GEREÇ ve YÖNTEM	29
2.1. Zakkum Ekstraktının Hazırlanması	29
2.2. Deney Hayvanları	29
2.3. Tedavi Edici Uygulamalar	29
2.4. Deney Gruplarının Oluşturulması	30
2.5. Sol Ventrikül Papiller Kas Aksiyon Potansiyeli ve Kasılma Kayıtlarının Alınması	31
2.6. Kan Biyokimyasal Parametrelerinin Değerlendirilmesi	34
2.7. Histopatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi	34
2.8. İstatistiksel Analiz	35
3.BULGULAR	36

3.1. Deney Hayvanlarının Genel ve Biyokimyasal Parametrelerinin İncelenmesi 36
3.2. Histopatolojik Parametrelerin İncelenmesi 37
3.3. Nerium oleander Tedavisinin Aksiyon Potansiyeli Parametreleri Üzerine Etkisi 39
3.4. Kasılma Parametreleri Üzerine Nerium oleander Tedavisinin Etkisi 41
4.TARTIŞMA 44
5.SONUÇ ve ÖNERİLER 47
6. ÖZET 48
7. SUMMARY 49
8. KAYNAKLAR 50
9. EKLER 57
EK. A: Etik Kurul Kararı 57
10. ÖZGEÇMİŞ 58

SİMGELER VE KISALTMALAR

$[Ca^{+2}]_i$: Hücre İçi Ca^{+2} konsantrasyonu

$[Na^{+}]_i$: Hücre içi Na^{+} konsantrasyonu

ALL : Alloksan

Anvirzel™ : Nerium oleander'in steril filtre edilmiş liyofilize sıcak su ekstresi

AP : Aksiyon Potansiyeli

APD 25 : Aksiyon potansiyellerin repolarizasyonun %25'ine düşmesi için gerekli olan zaman

APD 50 : Aksiyon potansiyellerin repolarizasyonun %50'sine düşmesi için gerekli olan zaman

APD 75 : Aksiyon potansiyellerin repolarizasyonun %75'ine düşmesi için gerekli olan zaman

APD 90 : Aksiyon potansiyellerin repolarizasyonun %90'nına düşmesi için gerekli olan zaman

AST : Aminotransferaz

CT50 : Kasılmaların tepe değerin %50'sindeki türev ortalama değeri

DM : Diabetes mellitus

g_{CaL} : L tipi Ca^{+2} kanal iletkenliği

g_{K1} : İçeri doğrultucu K^{+} iletkenliği

HMM : Ağır meromiyozin

I_{CaL} : L tipi Ca^{+2} kanal akımları

I_{K1} : İçeri doğrultucu K^{+} akımı

I_{Ks} : Kararlı durum K^{+} akımı

I_{Na} : Na^{+} akımı

I_{to} : Geçici dışarı doğru K^{+} akımı

KOLE : Kolesterol

KON : Kontrol

LMM : Hafif meromiyozin

MSS : Merkezi sinir sistemi

NCX : Na^{+}/ Ca^{+2} değiş-tokuşcusu

NF-κB : Nükleer faktör kappa B

NO : Nerium oleander

OZ : Oral Nerium oleander

POZ	: Profilaktik Nerium oleander
PT	: Kasılmaların tepe değeri
RMP	: Ortalama dinlenim zar potansiyeli
RT50	: Gevşeme fazının %50'sindeki türev ortalama değeri
RT90	: Gevşeme fazının %90'nındaki türev ortalama değeri
SR	: Sarkoplazmik retikulum
STZ	: Streptozotosin
TG	: Trigliserit
TP	: Aksiyon potansiyellerin tepeye çıkış süreleri
TPA	: 12- O- tetradecanoylphorbol-13-acetate

1. GİRİŞ

Günümüzde bitkisel kaynaklı ilaç ve ilaç hammaddelerinin kullanımına ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Ayrıca son yıllarda bitkiler üzerinde çok sayıda biyolojik aktivite deneyleri yapılarak aktif maddeler belirlenmekte ve aktiviteler bilimsel olarak kanıtlanmaktadır. Ebers papirüslerinden edinilen bilgilere göre diyabetin tedavisi amacıyla tıbbi bitkilerin kullanımı M.Ö. 1550 yıllarına kadar uzanmaktadır (Pushparaj ve ark 2000). Dünyanın pek çok yerinde çeşitli bitkiler, diyabetin tedavisi için geleneksel yöntemlerle kullanılmaktadır. Kullanılan bu geleneksel bitki tedavilerinin bir kısmı bilimsel çevrelerce dikkate alınmakta ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bu alandaki çalışmaları desteklemektedir (WHO 1986). Modern tıpta diyabetin tedavisinde insülin ve/veya oral antidiyabetikler kullanılsa da özellikle gelişmekte olan ülkelere bu ilaçların sağlanması, saklanması, uygulanması, ilaçların yan etkileri gibi nedenlerden dolayı alternatif olarak yeni, doğal veya sentetik antidiyabetik ilaç arayışlarına yönelim başlamıştır (Marles ve Farnsworth 1995). Ülkemizde de çeşitli bölgelerde diyabet tedavisi için bitkisel uygulamalara başvurulduğu bilinmekte (Bozan ve ark 1997, Erol ve ark 1997, Özbek 2002), ayrıca tıbbi bitkilerin hipoglisemik etkileri üzerinde bilimsel çalışmalar yapılmaktadır (Akev ve ark 1991, Kavalalı ve ark 1998, Özbek ve ark 2002).

1.1. Kalp Kası

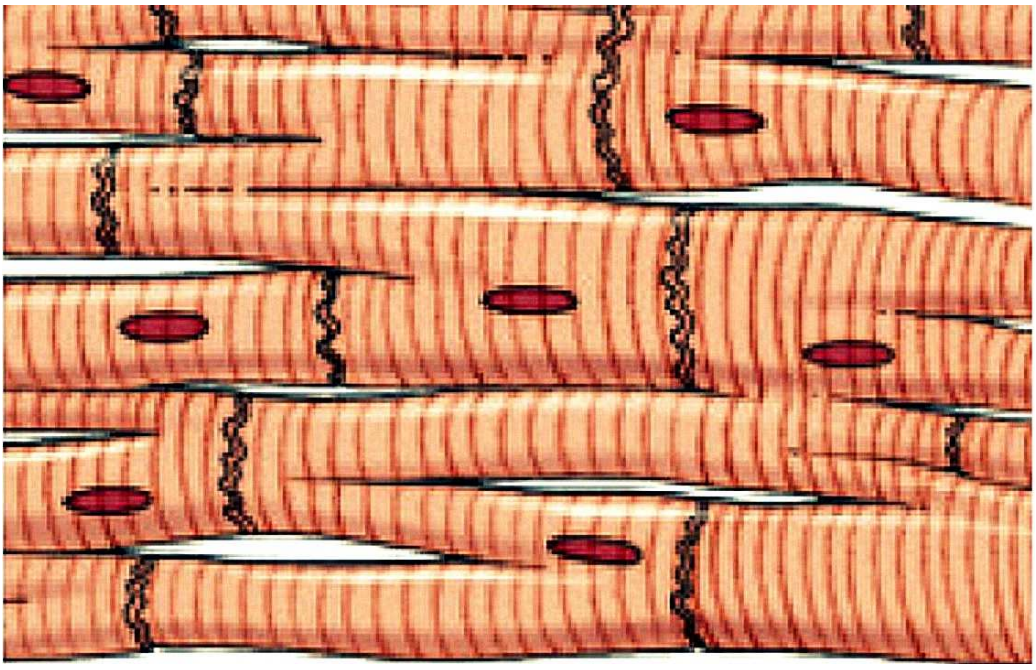
“Kalp, iki ayrı pompadan oluşur: Akciğere kan pompalayan sağ odacıklar ve çevre organlara kan pompalayan sol odacıklar. Bu odacıkların her biri, bir atriyum ve bir ventrikülden oluşan iki bölmeli bir atım pompasıdır. Atriyum, ventrikül için zayıf bir hazırlayıcı pompa (ön-pompa) işlevi görür, başlıca görevi kanın ventriküllere taşınmasına yardımcı olmaktır. Ventrikül ise kanı pulmoner ya da periferik dolaşıma gönderen ana pompalama kuvvetini sağlar” (Tıbbi Fizyoloji, 103, 2006).

“Kalpteki özel mekanizmalar, hareket potansiyellerini kalp kasının her yerine iterek kalbin ritmik atımlarını, kalp kasılmalarının düzenli ve sürekli olarak

tekrarlanması anlamına gelen kalbin ritmikliğini sağlarlar" (Tıbbi Fizyoloji, 103, 2006).

Kalp başlıca üç tip kalp kasından meydana gelir. Bunlar; atriyum, ventrikül, özelleşmiş uyarıcı ve iletici kas lifleridir. Atriyum ve ventrikül kasları, kasılma süresinin daha uzun olması dışında, iskelet kasına oldukça benzer şekilde kasılırlar. Çok az miktarda kasılabilir fibril içeren özelleşmiş uyarı ve ileti lifleri ise, yalnızca belli belirsiz kasılırlar. Bunun yerine ya aksiyon potansiyeli biçiminde otomatik ve ritmik elektrik ateşlemeler sergileyerek ya da aksiyon potansiyellerini kalbin her yerine ileterek kalbin ritmik olarak atmasını düzenleyen bir uyarı sistemi sağlarlar.

Şekil 1.1.' de bölünen, bir araya gelen ve tekrar ayrılan kalp kası liflerinin, dantel işine benzer şekilde düzenlendiği görülmektedir. Kalp kasının tipik bir iskelet kası gibi çizgili olduğu da bu görünümden hemen anlaşılmaktadır. Dahası, kalp kasının tipik miyofibrilleri, iskelet kasındakilerin hemen hemen aynı olan aktin ve miyozin filamentleri içerirler. Bu filamentler yan yana dizilmişlerdir ve kasılma sırasında, iskelet kasında olduğu gibi, birbirleri üzerinde kayarlar.



Şekil 1.1. Kalp kasının histolojik görünümü (Tıbbi Fizyoloji, 103, 2006).

"Şekil 1.1.'de kalp kası liflerinin enine kestiği görülen koyu alanlara interkale disk adı verilir. Bunlar aslında, kalp kası hücrelerini birbirinden ayıran hücre

zarlarıdır. Öyle ki, kalp kası lifleri, birbirine seri ve paralel bağlanmış çok sayıda ayrı hücrelerden meydana gelirler" (Tıbbi Fizyoloji, 103, 2006).

Hücre zarları interkale disklerde birbirleriyle kaynaşarak geçirgen "haberleşen" bağlantıları (yarık bağlantı) oluştururlar ki bu bağlantılar iyonların neredeyse serbestçe, difüze olmalarına izin verirler. Dolayısıyla, işlevsel bir bakış açısıyla iyonlar kalp kası liflerinin uzun ekseni boyunca hücre içi sıvıda kolaylıkla hareket ederler, öyle ki aksiyon potansiyelleri interkale diskleri geçerek bir kalp kası hücresinden bir sonrakine kolaylıkla ilerlerler. Pek çok kalp kası hücresinden meydana gelen bir sinsityum olan kalp kasında, hücreler birbirlerine o şekilde bağlanmışlardır ki, hücrelerden biri uyarılınca, aksiyon potansiyeli hücreden hücreye geçerek tüm ara bağlantılar boyunca hücrelerin tümüne yayılır.

"Komşu liflerin hücre zarları, kas lifinin disklerin her iki yanında kalan yan yüzleri boyunca oldukça uzun bir mesafeye kadar kaynaşarak, gap (gedik) kavşaklar oluşturur. Bu kavşaklar uyarımın bir kas lifinden diğerine yayılması için düşük dirençli köprüler oluşturur. Ayrıca bu kavşaklar, hücreler arasında protoplazmik köprülerin bulunmamasına karşın, kalp kasının tek bir parçasıymış gibi (sinsityum) işlev görmesini sağlar. Kalp kasında T sistemi, memeli iskelet kasında olduğu gibi A-I kavşağı yerine Z çizgileri hizasına yerleşiktir" (Ganong'un Tıbbi Fizyolojisi, 29, 1999).

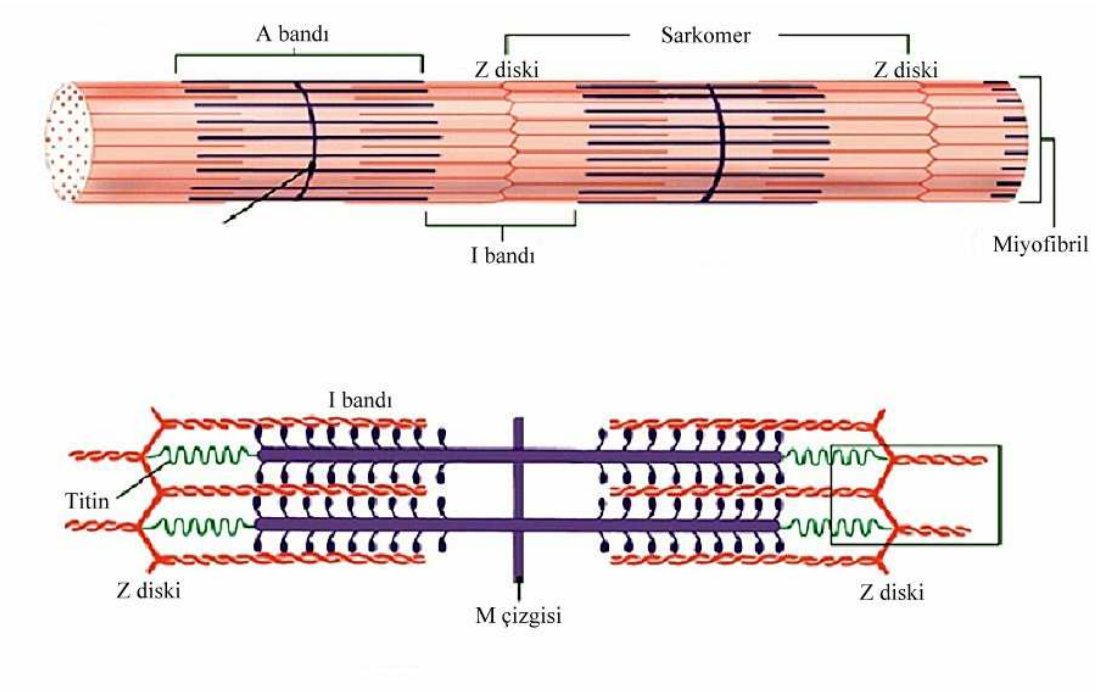
Miyozin aktin filamentlerinin kısmen iç içe girmesi nedeniyle miyofibriller şekil 1.2.' de görüldüğü gibi birbirini izleyen bantlar oluşturur. Bu kırmızı renkli bantlar aktin filamenti içerir ve I bandı adını alır. Mor renkli bantlar ise miyozin filamentlerini ve aralarına girmiş aktin filamentlerinin uçlarını içerir ve A bandı adını alır. İki Z çizgisi arasında kalan miyofibril bölümüne sarkomer denir.

Kalbin histolojik yapısı incelendiğinde üç tabakadan oluştuğu görülür;

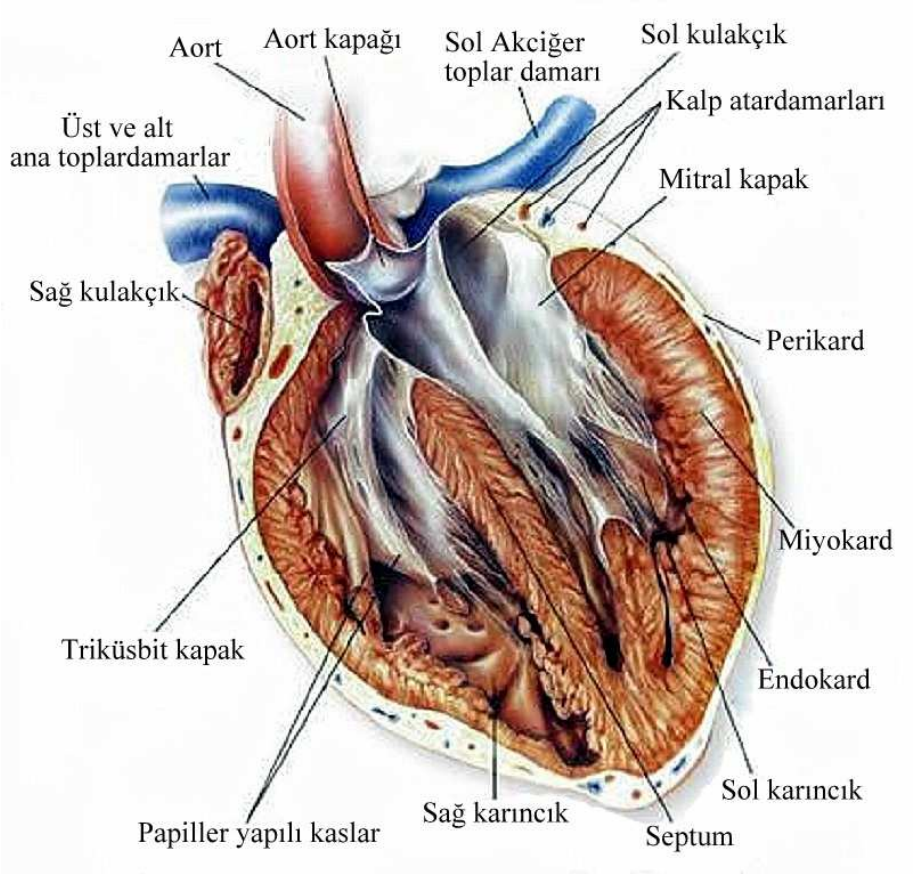
1) Endokardium (iç katman): Tek katlı epitel dokudan meydana gelir, kan damarları bulunmaz.

2) Myokardium (orta katman): Kalbi besleyen koroner damarlar bulunur ve dakikada 72 kez kasıldığı düşünülürse ortalama bir yetişkinde günde 100.000 den fazla kasılır.

3) Epikardium (dış katman): Perikardiyum ya da perikardiyal kese, kalbin etrafını saran çift tabakalı, kapalı, kese biçimindeki bir zar yapıdır. Katlar arasında sürtünme önleyici perikard sıvısı vardır. Perikard sıvısı, yaklaşık olarak 5-10 ml. düzeylerinde, berrak ve soluk sarı renkte bir sıvıdır. Bu sıvı, kalp perikardiyal kese içerisinde hareket ederken sürtünmenin azaltılmasına yardımcı olmaktadır. Fibröz perikardiyum adı verilen sert, fibröz bağ dokusundan oluşan bir dış tabaka ile seröz perikardiyum olarak adlandırılan ince, basit skuamöz epitelden oluşmuş geçirgen (saydam) bir iç tabakadan oluşmaktadır.



Şekil 1.2. Kalp kası kayan filament modelini oluşturan aktin ve miyozin filamentlerinin gösterimi. Kırmızı renkli bantlar I bandını, mor renkli bantlar ise A bandını temsil etmektedir.



Şekil 1.3. Kalbin histolojik yapısı.

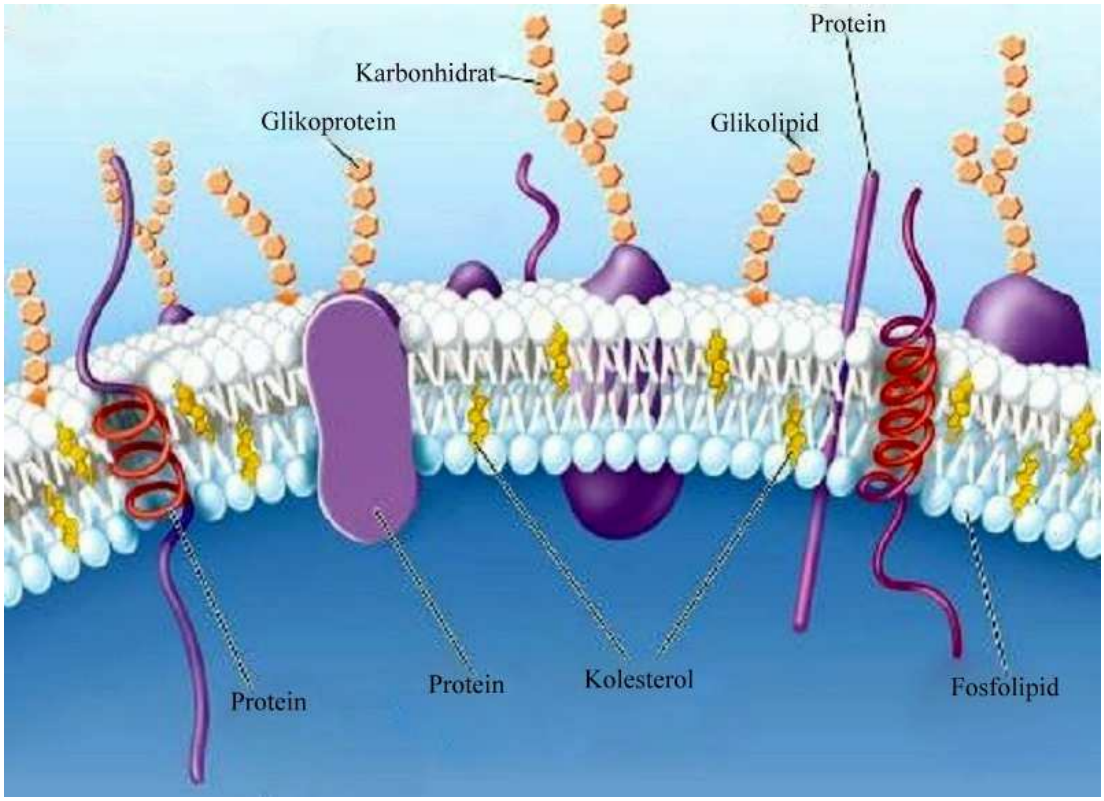
1.2. Kalp Kası Hücre Zarı Yapısı ve Fonksiyonları

Zarlar (sarkolemma, T-sistemi ve SR'de bulunan gibi), miyokard hücresinde pek çok önemli elektriksel ve kimyasal süreçleri kontrol ederler. Kalp kası hücresinde sarkolemma adı verilen zar, hücre içi ortamı (sitozol) dış ortam sıvısından (intertisiyel sıvı) ayırırken, hücre içindeki diğer zarlar, hücrenin çeşitli bölgelerini birbirinden ayırırlar. Zarlar kısaca, kendilerinin ayırdıkları bölmeler arasındaki iyon ve diğer moleküllerin geçişlerini regüle ederek kalp içinde hem elektriksel hem de kimyasal süreçleri kontrol eden akışkan özelliğinde dinamik ve organize sistemler olup, kısaca sıvı-kristal yapı özelliğine sahiptirler. (Stryer 1988).

Şekil 1.4.'te görüldüğü üzere bütün biyolojik zarlar temel olarak, fosfolipid, protein ve karbonhidrat olmak üzere üç ana grup yapı taşından oluşmuş lipid çift tabakasıdır (lipid bilayer) (Katz ve ark 1991). Bu moleküllerde hidrofilik bir baş ve hidrofobik bir kuyruk bölgesi vardır. Lipid çift tabaka birbirine paralel yerleşmiş iki sıra fosfolipidden ibaret olup, hidrofobik etkileşmeler sonucu kuyruk bölgelerinin bu

yapının iç kısımlarında bir araya gelmesi ve hidrofilik baş bölgelerinin sulu çözeltiye bakacak şekilde dışarıya dönük yerleşmeleri sonucu bu yapı oluşur (Singer ve Nicolson 1972). Bu lipid yapı içerisinde integral zar proteinleri olarak adlandırılan proteinler yerleşmiştir. Bu proteinlerde bulunan hidrofobik rezidüler onların lipid çift tabakasının hidrofobik iç kısmına yerleşebilmelerini sağlar. Ayrıca membranlara daha gevşek bir şekilde tutunan periferal proteinler, daha hidrofilik bir yapıya sahip olup, birkaç hidrofobik rezidü ya da rezidülere bağlanmış yağ asitleri ile zarlara tutunurlar.

Hücre bütünlüğünün korunmasında önemli rol oynayan ve farklı kimyasal içerikli ortamları birbirinden ayıran biyolojik hücre zarları, $1\,\mu F/cm^2$ gibi oldukça büyük bir sığaya sahiptirler ve bu özellikleriyle farklı elektriksel potansiyellere sahip bölgeleri birbirinden ayırabilirler. Elektriksel olarak yalıtkan özelliğine sahip olan biyolojik zarlardaki lipid çift tabakasının dielektik sabiti boşluğun dielektrik sabitinin (ε_0) yaklaşık 2-3 katı kadar olup, kalınlıkları ise 2-10 nm arasında değişir.

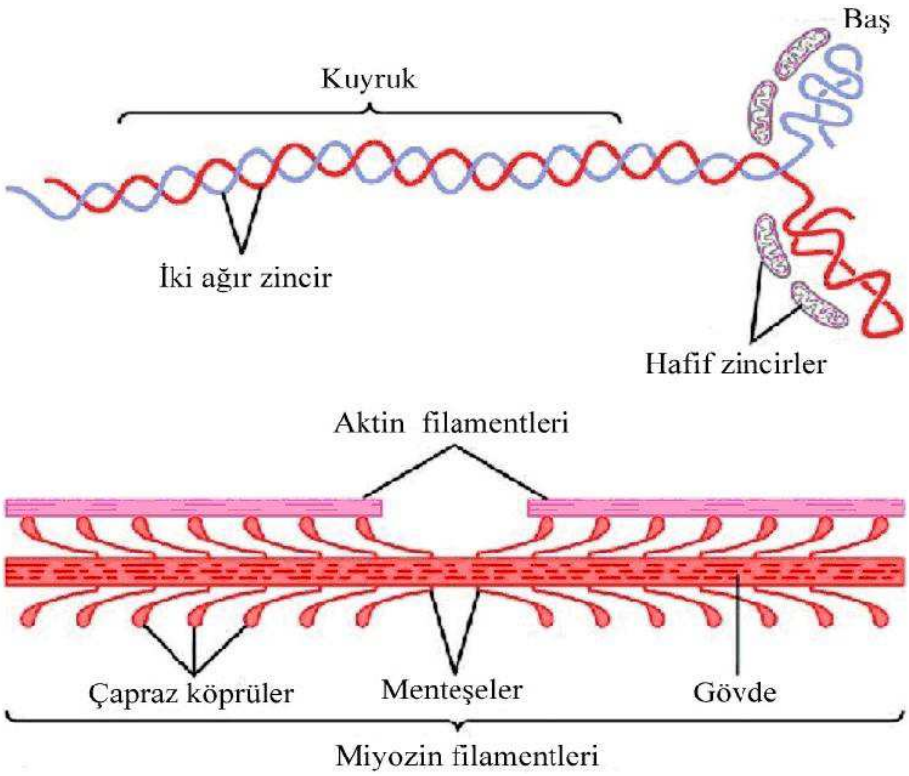


Şekil 1.4. Sıvı mozaik modele göre lipid çift tabakasının, membran proteinlerinin ve membranın yapı taşı olan fosfolipid molekülünün genel yapısı.

1.3. Kontraktil Proteinler

Kimyasal enerjiyi elektrik, ısı ve mekanik enerjiye dönüştüren ve miyofibrillerden oluşan kas dokusu, kasılma mekanizmalarındaki enerji gereksinimini, ATP'nin ADP'ye hidrolizinden sağlar. Miyokardiyal kasılma ve onun kontrolü, farklı yapı ve işlevdeki kasılma proteinler (miyozin, aktin, tropomiyozin, troponin C, troponinI, troponin T) ile hücre içi serbest kalsiyum iyonu konsantrasyonu, $[Ca^{+2}]_i$, arasındaki etkileşimlerle gerçekleşmektedir. Bu proteinler, kardiyak kasılmanın üç önemli özelliğini yansıtırlar: (1) ATP'yi hidroliz ederek kimyasal enerji açığa çıkarırlar, (2) kasın kısalmasını ve kuvvet oluşturmasını sağlayacak fizikokimyasal değişikliklere uğrarlar ve (3) hücre yüzeyinde yayılan uyartı ile çiftlenim yapan Ca^{+2} tarafından yönlendirilerek etkileşime girerler (Hill 1989, Katz 1992).

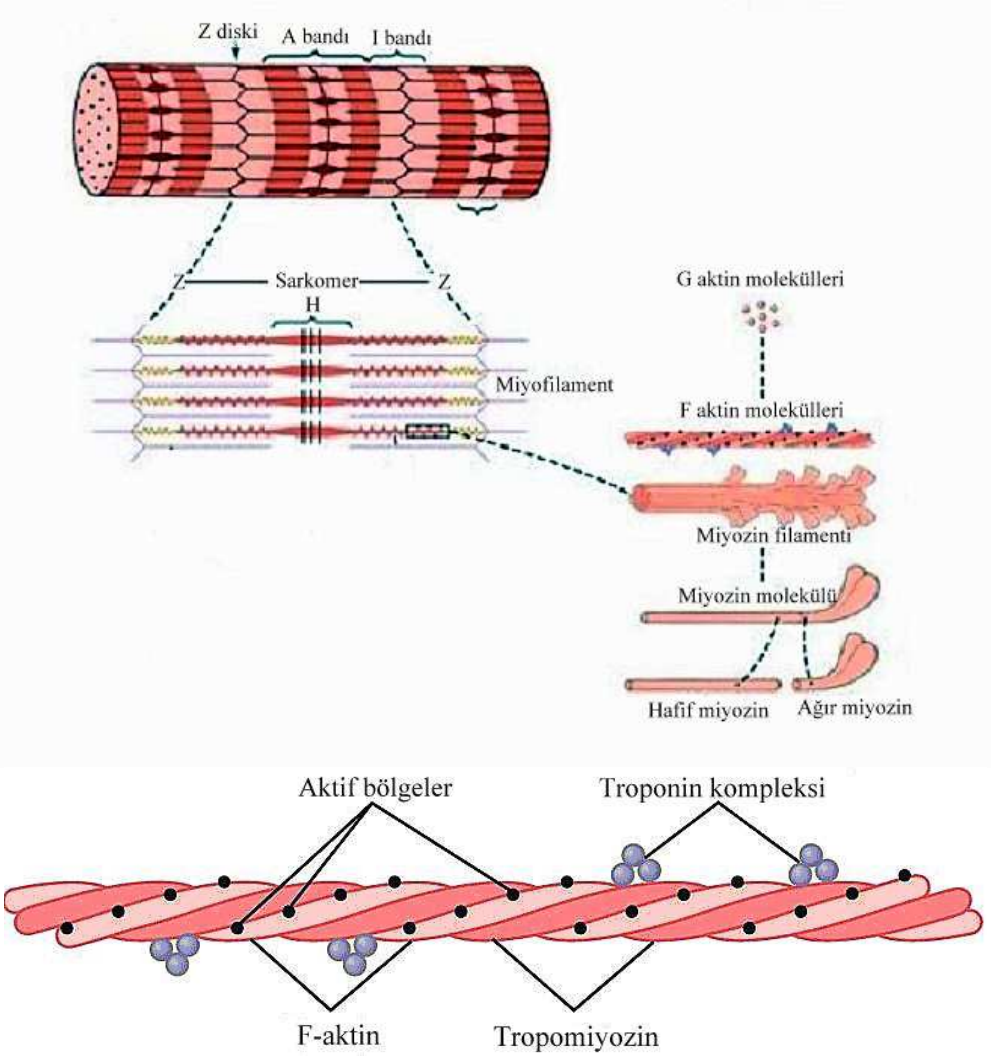
Kasın kalın filamentlerini oluşturan esas protein miyozindir. Uzunlamasına dizilmiş miyozin moleküllerinin rijit kuyrukları, bu filamentlerin gövdesinde örülmüştür. Buna karşın enzimatik olarak, aktif başlar çapraz köprüler halinde tasarlanmıştır. Bu molekülün hafif meromiyozin (LMM) olarak adlandırılan kuyruk kısmı rijit ve bir çift α-heliks peptid zincirinden oluşan sarmal bir yapıdadır. Şekil 1.5.'de görüldüğü gibi miyozinin globüler konformasyonunu oluşturan baş kısmı ise, iki ağır zincirden oluşur ve ağır meromiyozin (HMM) olarak adlandırılır. Kardiyak miyozinlerin boyun bölgesinde, iki çift hafif zincir mevcuttur ve bu zincirler, Ca^{+2} ile bağlanabilen proteinler grubundadır. Miyozindeki ağır zincirler ATPaz aktivitesini ve kasılma hızını belirler. Ağır ve hafif meromiyozinin birleştiği nokta miyozinin bükülebildiği noktadır. Ayrıca hafif zincirlerin takılı olduğu boyun kısmı ile baş kısmı birbirinden ayrıştırılabilir. Bu noktada, miyozinin bükülebildiği ve aynı zamanda esnek olduğu bölgedir (Katz 1992).



Şekil 1.5. Miyozin molekülünün yapısı.

Miyozine göre daha küçük bir molekül olan aktin filamenti, iki sıra G-aktin (globüler aktin) monomerlerinin sarmal yapılanmasıyla oluşan şekil 1.6.' da görülen F-aktin (fibröz aktin) polimeri, ince filamentin esas yapısını oluşturur. İnce filamentin yapısına katılan diğer molekül ise, tropomiyozindir. İki α -heliks peptid zincirinin, bir disülfid köprüsüyle bağlanmasından oluşan tropomiyozin (Lehrer 1978), F-aktin sarmalı ile yine sarmal bir yapıdadır. Tropomiyozin, aktin ve miyozin arasındaki etkileşimi regüle eder (Murray ve ark 1982) ve troponinle birlikte kasılmanın tetiklenmesinden doğrudan sorumludur. İnce filamentlerin yapısına katılan son bileşen ise, troponin kompleksidir ve troponin I, troponin C ve troponin T olmak üzere, üç ayrı proteinden oluşur (Ebasfi ve ark 1969). Troponin I, aktinmiyozin etkileşimini tek başına inhibe ederken, tropomiyozin ile birlikte güçlü bir regülatör rolü oynar. Kalp kaslarında, hızlı ve yavaş iskelet kaslarında birbirinden farklı biçimlerde bulunan troponin I, kalp hücrelerindeki formunda serin içerir. Serin, protein kinaz A'nın fosforilasyonunun bir ara maddesidir. Kardiyak troponin I'nın fosforilasyonu, troponin C'nin Ca^{+2}'a ilgisini azaltır, bu da gevşeme yararına işleyen bir mekanizmadır. Troponin C, 9-dönmeli α -heliks ile birbirine bağlanmış iki globüler yapı ve bunların üzerinde 4 aminoasit sıralamasını içerir. Kardiyak troponin

C'nin, birinci aminoasit bölgesi hariç her aminoasit bölgesi, Ca^{+2} -spesifik bölgeler olup, 3. ve 4. bölgeler aynı zamanda Mg^{+2} - spesifiktir. Asimetrik bir molekül olan troponin T, troponin kompleksini tropomiyozine bağlar. Tek başına Ca^{+2} ile bağlanmaz, buna karşın kas geriminin Ca^{+2}'a bağlı duyarlılığını etkileyerek, kalbin Ca^{+2}'a olan yanıtını değiştirir (Katz 1992, Putkey ve ark 1989).



Şekil 1.6. Aktin, miyozin, tropomiyozin ve troponin moleküllerinin birbirleri ile ilişkisini gösteren model.

1.4. Kalp Kasındaki Elektriksel Olaylar

1.4.1. Ventrikül Aksiyon Potansiyeli

Kalp kası hücrelerinin zarı, yüksek dirençli lipit çift tabakası, içinin dışına göre negatif mili voltlar düzeyinde dinlenim zar potansiyeli gibi bazı temel elektriksel

özelliklere sahiptir. Zarda yer alan voltaj – bağımlı iyon kanallarının özellikleri ve çeşitliliği, kalbe kendiliğinden çalışabilme özelliğinin yanı sıra aksiyon potansiyellerinin (AP) biçimini de belirler. Bu AP'leri sadece hücrede kasılmayı tetiklemekle kalmaz aynı zamanda pek çok hücrenin kasılmasını koordine edip, kalbin bir pompa gibi çalışmasını da garanti altına alır (Katz 1992).

Diğer kas hücrelerine göre daha hızlı bir iletim özelliğine sahip olan kardiyomiyositlerdeki AP'leri, şekil 1.7.'de de görüldüğü gibi yaklaşık -80 mV dinlenim zar potansiyelinden küçük depolarizasyon ile başlayıp, akabinde hızlı bir depolarizasyonla zar potansiyelinin yaklaşık +30 mV' a kadar çıkması ile oluşur. Diğer kalp hücreleri ile karşılaştırılınca ventriküllerdeki AP süresi atriyumunkinden uzun, His Purkinje'ninkinden ise kısadır. Ayrıca ventriküller AP'e özgü erken bir repolarizasyon fazı da görülür (Katz 1992).

Ventrikül hücrelerinin dinlenim zar potansiyelinin oluşumunda da, sinir ve iskelet kasında olduğu gibi, K^+ belirleyici rol oynar. Kalp dokularında Cl^- iletkenliğinin katkısı bağıl olarak küçüktür. Bunun yanında, zamandan bağımsız Na^+ geçirgenliğinin de dinlenim zar potansiyeline küçük bir katkısı vardır. Kalp kasında, birkaç farklı türden K^+ kanalı bulunur ve dinlenim zar potansiyelini sağlayan K^+ iletkenlikleri ile (inward rectifier; I_{K1}), repolarizasyonu başlatan K^+ (transient outward; I_{to}) iletkenlikleri birbirinden farklıdır. Ayrıca bu kanallar için değişik alt tipler de tanımlanmıştır (Wahler 1997).

Kalp kaslarında Na^+ ve K^+ için konsantrasyon gradiyentleri aktif (ATP gerektiren) elektrojenik Na^+/K^+ pompası ile kurulur ve sürdürülür. Diğer dokularda olduğu gibi bu pompa, dışarıya çıkardığı her 3 Na^+' a karşılık, 2 K^+' u hücre içine taşır (Gadsby 1984) ve böylece küçük bir akım oluşturarak zarı polarize etmeye yönelik çalışır. Nispeten uzun bir kardiyak AP' ye nazaran, sadece yavaş bir repolarizasyonun varlığı, bir elektrojenik pompanın, repolarizasyonun ya kontrolünde, ya da başlamasında önemli bir rol oynayabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Gadsby 1984, Wahler 1997). Pek çok omurgalıda kalp hücreleri, içerideki protonları hücre dışına çıkaran Na^+/H^+ değiş – tokuş mekanizmasına (Na^+/H^+-exchange) sahiptir. Tıpkı Na^+/Ca^{+2} değiş – tokuş mekanizmasında (Na^+/Ca^{+2}-exchanger, NCX) olduğu gibi, bu mekanizma da Na^+ gradiyentine bağlı olarak

çalışır. Bu mekanizma hem hücre içi serbest sodyum iyon konsantrasyonu ($[Na^+]_i$), hem de hücre içi pH' nın regülasyonunda rol oynar (Katz 1992, Wahler 1997, Bers 2002).

Ventriküller için ölçülen toplam AP süresi 200 ile 400 ms arasında değişmektedir. Ayrıca çalışmalar çeşitli iyon kanallarının özellikleri değiştiği zaman AP süresinin değişebildiğini göstermektedir (Magyar ve ark 1992, Shimoni ve ark 1998, Ayaz ve ark 2004).

1.4.2. Ventriküler Aksiyon Potansiyelinde Rol Alan İyonik Akımlar

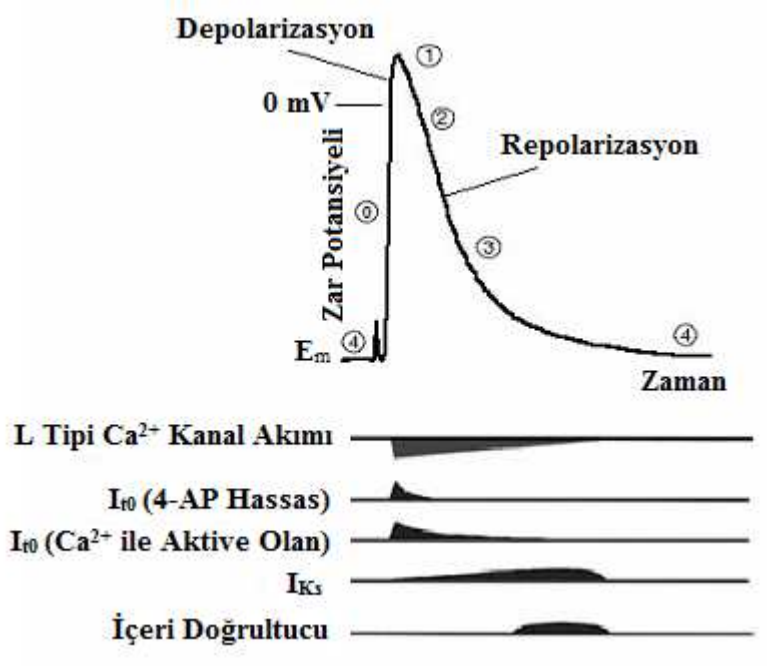
Ventrikül hücreleri için kaydedilen AP ve altında yatan iyonik mekanizma şekil 1.7.'deki gibi özetlenebilir. Zar üzerinde yer alan hızlı Na^+ kanallarının aktivasyonu ile oluşan hızlı Na^+ akımları (I_{Na}), AP'nin başlangıcındaki hızlı depolarizasyon fazından (*faz 0*) sorumludur. Bu hızlı aktive olan kanallar aynı zamanda hızlı inaktive olma özelliğine de sahiptirler.

Kalbin farklı bölgelerinde farklı yoğunluklarda gelişen başka bir K^+ kanalı ise *faz1* (hızlı repolarizasyon) den sorumlu olan geçici dışarı doğru K^+ – akımıdır (I_{to}). Bu K^+ – kanallar depolarizasyonun hemen arkasından aktive olmakta ve geçici akımlar oluşturmaktadır.

Faz 2 olarak nitelendirilen plato evresinde, L-tipi Ca^{+2} kanallarının oluşturduğu depolarize edici Ca^{+2} akımı (I_{CaL}), Na^+ kanallarına göre daha yavaş aktive ve inaktive olurlar. Depolarizasyon, faz 2'nin başlamasında önemli rolü olan içeriye-doğrultucu K^+ iletkenliğinin (g_{K1}) azalmasına neden olmaktadır.

Faz 3' de (repolarizasyonun sonlanması) birkaç olay birlikte gerçekleşir. Kısaca; (i) L tipi Ca^{+2} kanalı iletkenliğinin (g_{CaL}) zamana bağlı olarak azalması sonucu depolarize edici yavaş akım azalması, (ii) depolarizasyonla aktive olan, başka bir K^+ kanalı populasyonunun (I_{Ks}) yavaş inaktivasyonu, (iii) repolizasyonun artışı sonucu içeriye doğrultucu K^+ iletkenliğinin (g_{K1}) yeniden aktive olması bu fazın oluşumunda önemli katkıya sahiptir.

Ventrikül hücrelerinde *4. faz* dinlenim potansiyelinin sağlanmasıdır. Zar K^+ iyonlarına yüksek geçirgenlik gösterdiğinden potasyum denge potansiyeline yakın bir değer almaktadır. Dinlenim potansiyeli büyük oranda I_{K1} tarafından belirlenmektedir.



Şekil 1.7. Ventrikül aksiyon potansiyelinin evreleri ve onlara karşılık gelen iyonik akımlar. Daire içinde yer alan rakamlar aksiyon potansiyelinin farklı fazlarını simgelemektedir. Zar potansiyelinin bulunduğu değerden daha pozitif değere hareketi depolarizasyon, bu noktadan dinlenim zar potansiyeline geri dönüşü ise repolarizasyon olarak adlandırılmaktadır. Alt kısımda ventrikül AP'e oluşumunda rol alan iyonik akımlar (kısaltmalar ve detaylı bilgi için metine bakınız) (Ravens ve ark 1996).

1.5. Kalp Kasında Kasılma Mekanizması

1.5.1. Kayan Filamentler Modeli

Kalp kası hücrelerinin gevşek (relaxed) konumdan aktif konuma geçmelerine kasılma (contraction) adı verilir. Kasılma, kasta kısalmanın oluşup oluşmadığına veya mekanik bir işin yapılıp yapılmadığına bakılmaksızın kullanılan bir terimdir ve prensipte kasılma, hücre içindeki serbest kalsiyum iyon konsantrasyonu, $[Ca^{+2}]_i$, ile yönetilir. Kasılma çevriminde önce $[Ca^{+2}]_i$ yükselir ve bu miyofilamentlerin mekanik kasılma çevrimini tetikler, sonra ($[Ca^{+2}]_i$) seviyesi düşer ve kas gevşer. Tek bir

kasılma – gevşeme çevrimine, bir atım veya sarsı (twitch) adı verilir (Hibberd ve Trentham 1986).

Uyarılma, kas lifi yüzey zarında yayılan depolarizasyonun transvers tübülüsler (T-sistem) aracılığı ile kısa sürede iç bölgelere yayılmasıyla başlar (Spach ve Kootsey 1983). Voltaj-bağımlı Ca^{+2}- kanallarından hücre içine giren Ca^{+2} salınımını tetikler (>500 nM). Her bir kalp atışı sırasında, $[Ca^{+2}]_i$ önce hızla yükselir ve sonra ilk durumuna yavaş yavaş geri döner. Hücre içi serbest kalsiyum iyon konsantrasyonu düşük olduğu zaman (dinlenimde), miyozinin aktine kuvvetli bağlanma eğilimi, ince filamentlere bağlı durumda bulunan troponin ve tropomiyozin proteinleri tarafından inhibe edilmiş durumdadır.

Depolarizasyonu takiben artan $[Ca^{+2}]_i$ ($>10^{-6}$ M) ile Ca^{+2} troponine bağlanır ve hem troponin, hem de tropomiyozin konformasyon değişikliğine neden olur. Böylece konformasyonel inhibisyon ortadan kalkar ve aktin üzerindeki aktif bölgeler açığa çıkar. Sonuçta, ince filamentler aktive olur ve kalın filamentlerin çapraz köprü adı verilen lateral uzantılarıyla etkileşime girerler. Tüm bu konformasyonel değişiklik ve ince filamentlerin aktivasyonu zaman alıcı bir süreç (milisaniyenin onda biri) olduğundan, mekanik aktivasyon $[Ca^{+2}]_i$ artışından sonra başlar.

Aktin ve miyozin proteinlerinden oluşan aktomiyozinler ise, ATP' nin hidrolizinden elde edilen kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye dönüştürür. Böylece kasılma sürecinin aktin, miyozin ve ATP arasındaki etkileşimlerin sonucu gelişeceği açıktır.

Kayan filamentler modeli, bir kasın boyu kısalırken, filamentlerin boylarının sabit kalmasına dayalı olarak ortaya atılmıştır (Huxley 1957). Sarkomer kısaldıkça ince filamentler kalın filamentlerin içinde kayarlar, bu da A-bandının sabit kalmasına rağmen, I-bandının kısalmasına yol açar. Kasılma sırasında ince filamentler kalın filamentlerden uzanan çapraz-köprülerin hareketi ile sarkomerin ortasına çekilirler. Mekanik ve kimyasal sıralaması birbiriyle ilişkili olarak gösterilmiş olan kasılma çevrimi, 4 aşamada ele alınmıştır (Katz 1992, Katz 1970, Stryer 1988).

1) Aşama - Miyozin bağlı ATP'nin hidrolizi: Kasılma sonunda aktinden ayrılıp ATP ile bağlanan miyozin (miyozin-ATP), katalitik etkisi ile ATP'yi hızla hidroliz eder. Hidroliz sonucu oluşan ADP ve P_i ; ile bağlı kalan miyozin, yüksek enerjili konuma geçer. Miyozinin başı, ince filamente dik konumdadır. Ancak, aktin molekülündeki aktif noktayı örten troponin C, Ca^{+2} ile bağlamamışsa, miyozin yüksek enerjili olmasına rağmen aktinle etkileşemez ve bu durumda kas gevşektir.

Miyozin-ATP ⟶ Miyozin + ADP +P_i
(Gevşek) *(Gevşek ve Enerjili)*

2) Aşama - Aktinle aktif kompleksin oluşumu: Aktin molekülü üzerindeki aktif bölgeleri örten tropomiyozin-troponin aktif kompleksinin ortamda artan Ca^{+2} ile etkileşmesiyle (yani troponin C ile $Ca^{+2'}$ un bağlanmasıyla), aktin üzerindeki aktif bölge açığa çıkar ve miyozinin çapraz bağları ile etkileşim başlar. Bunun sonucunda, aktin ve miyozin arasındaki aktif kompleks (aktomiyozin) oluşur. Ancak, henüz çapraz bağlar hareketine başlamadığı için ATP'nin hidrolizinden gelen enerji harcanmamış ve mekanik dönüşüm gerçekleşmemiştir.

Miyozin + ADP + P_i + Aktin ⟶ Miyozin + 6 ADP + P_i
(Gevşek ve Enerjili) *(Aktif ve Kompleks)*

3) Aşama - ATP hidrolizi ürünlerinin ayrışması: Kimyasal enerjinin mekanik enerjiye aktarıldığı durumdur. Aktif komplekste tutulan enerji, kompleksten ayrışarak çapraz bağlara aktarılır ve mekanokimyasal değişim gerçekleşir. ADP ve P_i nin ayrışmasından sonra aktin ve çapraz köprü kompleksine "rigor kompleks" denir. Bu komplekste, miyozin molekülü baş kısmı oriyantasyonunu değiştirerek bükülür ve çapraz bağların, ince filamenti sarkomerin ortasına çekebileceği şekilde konumlanır. Bu reaksiyon, çapraz-köprü çevriminin en fazla zaman alıcı reaksiyonudur. Bu yüzden, ADP ve P_i'nin salındığı bu 3. aşama reaksiyon, kasın hız limitleyici reaksiyonudur. Aktif kompleks yüksek enerjili konumda iken, rigor kompleks düşük enerjilidir. Kuşkusuz bu enerji farkı, çapraz köprü hareketinde harcanmaktadır. Son derece kararlı (stable) olan rigor kompleks, rigor bağı ayırabilecek ATP yok ise çevrime yeniden giremez. İskelet kasındaki sertlikten (rigor mortis) veya kalbin iskemik kasılmasından (stone heart), kasın bu düşük enerjili konumu sorumludur.

$$\text{Aktomiyozin} + \text{ADP} + P_i \longrightarrow \text{Aktomiyozin} + \text{ADP} + P_i$$

(Aktif kompleks) *(Rigor kompleks)*

4) Aşama - Aktin ve Miyozinin Ayrışması: Çapraz köprüler çevrimlerini tamamlayarak başlangıç konumuna döner ve ATP miyozine bağlanır ve miyozine ATP bağlanırken aktin ayrılır. Böylece ATP nin varlığı, rigor kompleksini çözerek kası gevşetir.

$$\text{Aktomiyozin} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Miyozin} + \text{ATP} + \text{Aktin}$$

(Rigor kompleks) *(Gevşek)*

Hücre içi serbest Ca^{+2} konsantrasyonu düştüğü zaman, filamentlerin etkileşimleri zayıflar, kuvvet azalır ve kısalma sona erer. Eğer hücre gevşek durumdaki uzunluğuna dönemezse, pasif kuvvetler ile yeniden başlangıç uzunluğuna getirilir. Hücre içi serbest Ca^{+2} konsantrasyonu düşmesine rağmen kasılmanın biraz daha devam etmesi, çapraz köprülerin ayrılmasının yavaş bir işlem olduğunu düşündürmektedir (Katz 1992).

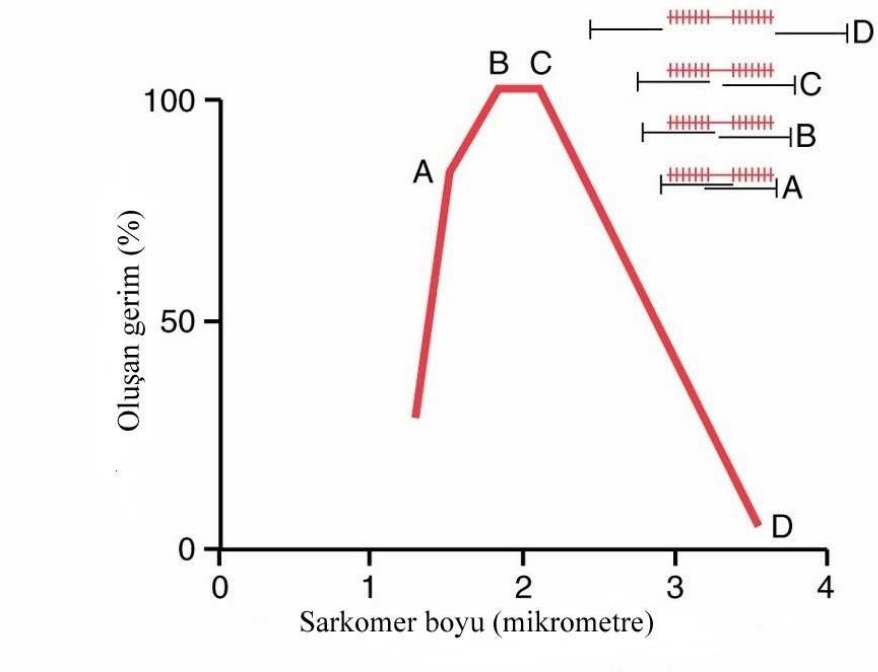
Sonuç olarak ATP ve ATP'nin hidrolizinin, hem kasılmada ve hem de gevşemede mutlaka gerekli olduğu açık olarak anlaşılmaktadır.

1.5.2. Kalp Kasının Mekanik Özellikleri

Doğrudan uyarılan kalp kası, bağlı olduğu bölgeler üzerinde, gelişen gerilmeye eşit bir kuvvet uygular. Kasılma sırasında kasın boyu sabit tutulursa (izometrik kasılma), kas zamanla değişen bir kuvvet oluşturur. Kasa uygulanan kuvvet sabit tutulursa, kas boyunda zamansal bir değişim (izotonik kasılma) gözlenir.

Şekil 1.8.' de sarkomer boyu ve miyozin – aktin filamentinin üst üste binme derecesinin, kasılan kas lifi tarafından oluşturulan aktif gerime etkisini göstermektedir. Sağda aktin ve miyozin filamentlerinin farklı sarkomer boylarındaki üst üste binme dereceleri siyah renkte görülmektedir. Şekildeki D noktasında aktin filamenti üst üste binmeden miyozin filamentinin uçlarına kadar çekilmiştir. Bu

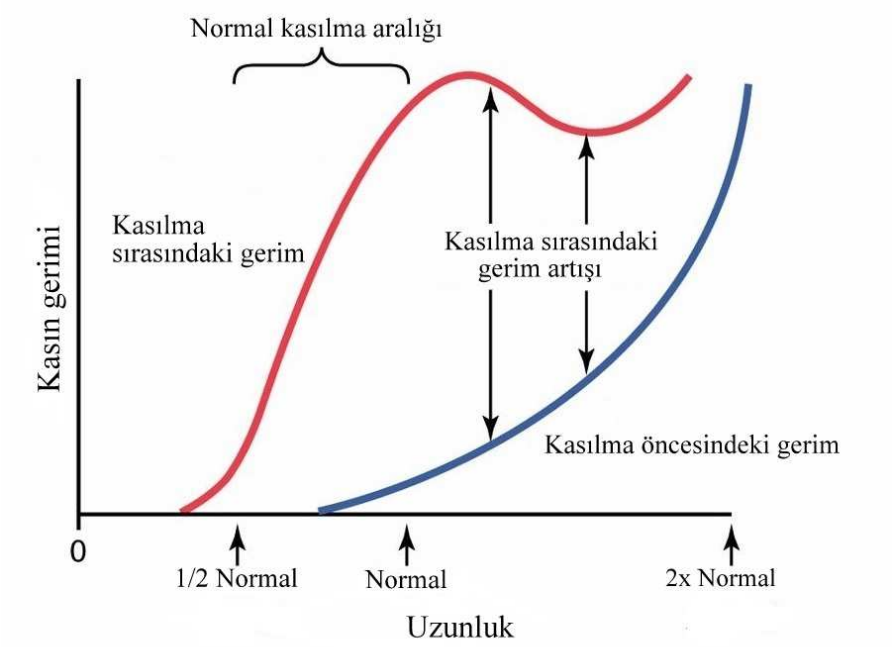
noktada aktif kas tarafından oluşturulan gerim sıfırdır. Daha sonra sarkomer kısaldıkça ve aktin filamenti miyozin filamentiyle üst üste bindikçe, sarkomer boyu yaklaşık 2,2 mikrometreye düşene kadar gerim giderek artar. Bu noktada, aktin filamenti miyozin filamentinin bütün çapraz köprüleriyle üst üste binmiştir fakat henüz miyozin filamentinin ortasına ulaşmamıştır. Daha ileriki kısalmalarda, sarkomer boyu 2 mikrometre olana kadar (B noktası), tam gerim devam eder. Bu noktada iki aktin filamentinin uçları birbirinin ve miyozin filamentlerinin üstüne binmeye başlar. Sarkomer boyu 2 mikrometreden 1,65 mikrometreye doğru düştükçe, A noktasında, kasılma gücü düşer. Bu noktada sarkomerin iki Z diski miyozin filamentlerinin uçlarına dayanır. Daha sonra, sarkomer boyunu kısaltan kasılma devam ettikçe, miyozin filamentlerinin uçları bükülür ve şekilde görüldüğü gibi kasılma gücü sıfıra yaklaşır ve kas en kısa uzunluğunda kasılır.



Şekil 1.8. Boyu 2,0 – 2,2 mikrometre iken en üst derecede kasılma gücü gösteren bir sarkomer için şekli.

Sağlam bütün bir kasta kas boyunun kasılma gücüne etkisi şekil 1.9' da görülmektedir. Bütün halindeki kasın içinde çok miktarda bağ dokusu vardır; ayrıca kasın değişik kısımlarındaki sarkomerlerin birlikte kasılmaları gerekmez. Dolayısıyla, eğri, tek kas lifi için gösterilenden farklı boyutlara sahip olmakla birlikte biçimi normal kasılma aralığındaki eğri ile aynı genel şekli sergiler.

Şekil 1.9’ da kas dinlenim boyunda iken yani sarkomer boyu yaklaşık 2 mikrometre iken, uyarıldığında en yüksek kasılma gücü ile kasılır. Aktif gerim olarak adlandırılan kasılma esnasında oluşan gerim artışı, kas normal boyutunun üstünde gerildiği zaman (sarkomer boyu 2,2 mikrometreden büyük olduğunda) düşer. Bu durum şekil 1.9’ da ok boyunda kasılma ile gösterilmiştir.



Şekil 1.9. Kas kasılması öncesinde ve kasılma sırasında kas boyunun kasılma gücü ile ilişkisi.

Diyastol sırasında ventrikül ne kadar kan ile dolmuş ise, kalp çapı artmakta (yani kas boyu uzamakta) doğan aktif gerim de o ölçüde artmaktadır (Starling yasası). Pasif gerim, kalp kasının kararlı durumda (steady-state) sahip olduğu gerim olup, diyostolik gevşekliği, yani kalbin kan ile dolabilirliğini gösterir (Katz ve Tada 1972, Mirsky 1973).

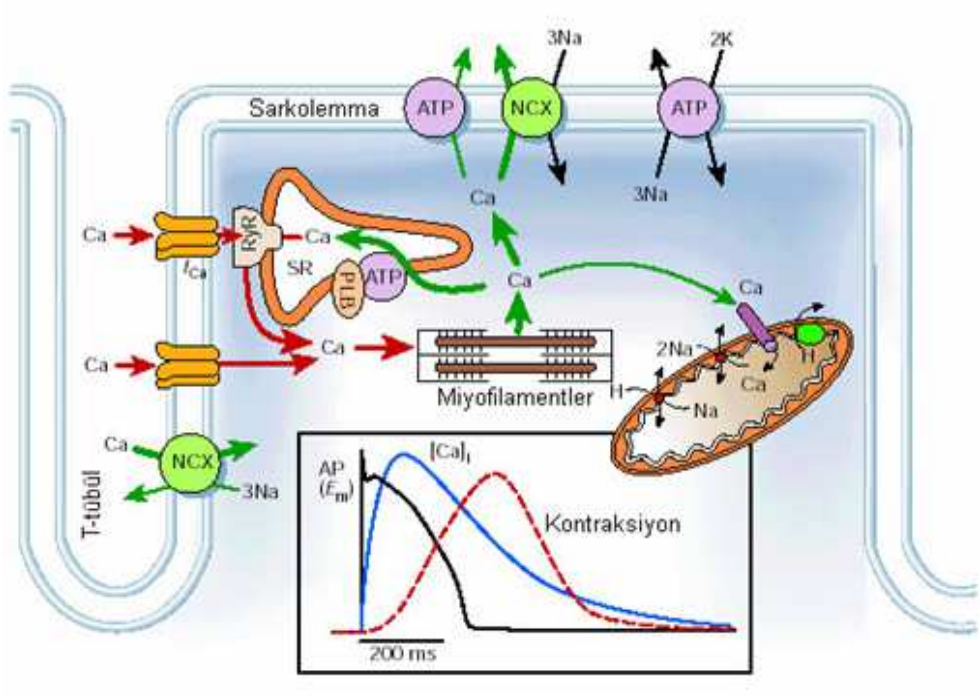
Kısaca kalp kasında kasılma mekanizması iskelet kasına benzerlik göstermesine rağmen, kalp aksiyon potansiyelinin süresinin iskelet kasına göre daha uzun olmasından ve kasılmayı kontrol altında tutmasından dolayı, kalp kasında iskelet kasından farklı bazı sonuçlar ortaya çıkar (Katz 1992, Katz ve Weisfeldtr 1991). Örneğin, AP süresi uzun olan kalp kasında, uyarı frekansının artması işe mekanik toplama ve tetanik kasılma gözlenemez. Ayrıca, sarkomer boyu, büyük ölçüde ön yükleme (preload) tarafından, yani diyastol sırasında kalbe dönen kan bir

önceki sistol sırasında ventrikülde kalan kan hacmi ile belirlenir. Bunlara ek olarak, kalp kasında, hücre dışı ortamın kollajenden zengin olması ve hücre içi organellerin iskelet kası hücrelerine göre farklı yapı ve dağılımda olması, kalp kasını iskelet kasına göre daha sert yapar. Bu sertlik sonucu, kalp kası uzamaya karşı büyük bir pasif gerilme ile direnir. Aynı şekilde görüldüğü gibi, aktif gerinim maksimum olduğu referans uzunluğunun (L_o) her iki yanında, aktif gerim azalırken, pasif gerim iskelet kasından farklı olarak L_o'dan çok küçük uzunluklarda da kendini göstermektedir.

1.5.3. Uyarılma Kasılma Çiftlenimi

Kalp kası hücresini saran sarkolemmanın elektriksel olarak eksitasyonu ile başlayıp kalbin kasılması ile sonlanan olaylar zincirine uyarılma-kasılma çiftlenimi (excitation-contraction coupling) adı verilir. Bir ikincil mesajcı olan Ca^{+2} hem kardiyak elektriksel aktivite hem de miyofilamanların doğrudan aktivatörü olması nedeniyle kasılma için gereklidir (Bers 2002). Hücre içi Ca^{+2}'un miyositler tarafından normal kontrol edilememesi kasılma fonksiyon bozukluklarına neden olabildiği gibi pek çok patofizyolojik durumun sebebi olarak da gösterilmektedir (Pogwizd ve ark 2001).

Kardiyak AP sırasında, L tipi Ca^{+2} kanallarından hücre içine giren Ca^{+2} SR' dan daha fazla Ca^{+2} salınmasını tetiklemektedir (Ca^{+2} induced Ca^{+2} release). Şekil 1.10.' de görüldüğü üzere salınan ve hücre dışından içeriye giren Ca^{+2} sitoplazmada serbest Ca^{+2} derişimini ($[Ca^{+2}]_i$) yaklaşık 100nM'dan 1μM seviyesine yükselttiğinde troponin C'ye bağlanmakta ve kasılma mekanizmasını tetiklemektedir. Troponin C-Ca^{+2} kompleksi tropomiyozin ile etkileşerek aktin ve miyozin miyofilamentleri arasındaki aktif bölgelerin açığa çıkmasını ve çapraz köprülerin oluşmasını sağlamaktadır. Böylece, sarkomer boyu kısalmakta ve kasılma gerçekleşmektedir. Miyositler için gevşeme sürecinin başlaması ise $[Ca^{+2}]_i$' un azalması ve bağlı bulunan Ca^{+2}' un ayrılması ile gerçekleşmektedir. Uyarılma ile artmış olan $[Ca^{+2}]_i$' un azaltılması dört farklı yolakla geçekleşmektedir. Bunlar; SR Ca^{2+}-ATPaz, NCX, sarkolemmal Ca^{+2}-ATPaz ve mitokondriyal Ca^{+2}'un tek yönlü (uniport) taşınımıdır.



Şekil 1.10. Ventrikül hücrelerinde Ca^{+2} düzenlenmesi. Çerçeve içindeki küçük şekil AP, geçici Ca^{+2} derişimi (Ca^{+2} transient) ve kasılmanın zamansal değişimlerini göstermektedir. Kısaltmalar; NCX, Na^{+}/ Ca^{+2} değiş-tokuşu; ATP, ATPaz; PLB, fosfolamban; SR, sarkoplazmik retikulum (Bers 2002).

1.6. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM), insülin salınımında kısmen ya da tamamen bir yetersizlik ve/veya değişik derecelerde insülin reseptör duyarlılığının azalması ile oluşan metabolik bozukluğu anlatır.

DM tüm dünya popülasyonlarında yaygın olan bir sağlık problemidir. Avrupa'da nüfusun yaklaşık %1-2' si diyabetlidir. Amerika Birleşik Devletleri' nde bu oran % 3-8' dir. Dünyadaki prevalansı yaklaşık 100 milyon iken gelecek 10–15 yılda bu sayının ikiye katlanacağı tahmin edilmektedir (Grover ve ark 2000). Hastalığın primer belirtisi, glikozüri, polidipsi ve poliüri ile seyreden hiperglisemidir (Sailaja ve ark 2003).

Diyabetes mellitus, insülin bağımlı (IDDM) olan tip I diyabet ve insülin bağımlı olmayan (NIDDM) tip II diyabet olarak farklı şekillerde görülebilmektedir. Tip I

diyabet otoimmun bir hastalıktır ve insülinin salınamadığı diyabet şekli olarak bilinirken, tip II diyabet pankreasın β hücrelerinin yetmezliğine ve insülinin hedef aldığı karaciğer, kas ve yağ doku gibi dokulardaki reseptör direncine bağlı olarak gelişir (Buren 2002, Quinn 2002).

Diyabetes mellitus' ta glikoz seviyesi kanda kronik bir şekilde yüksek seyreder. Kan insulin seviyesi, tip II diyabetin başlangıcında yüksek, ileri aşamadaki tip II diyabet için ve ayrıca tip I diyabette düşük seviyelerdedir. Deneysel olarak oluşturulan hiperinsülinemi modellerinde, insülin direncine neden olduğu in vitro (Garvey ve ark 1986, Henry ve ark 1996) ve in vivo (Rizza ve ark 1985, Bonadonna 1993, Iozzo ve ark 2001) olarak tespit edilmiştir. Hiperglisemi, insülin salınımının ve etkisinin bozulmasında tek başına etkili olabilmektedir (Unger ve Grundy 1985). Bu durum glikoz toksisitesi olarak da ifadelendirilmektedir (Rossetti ve ark 1990). Hiperglisemik durumdaki tip II diyabetli hastaların kaslarında, insülin-uyarıcılı glikoz transportunun zayıfladığı gözlenmiştir (Zierath ve ark 1994). Fizyolojik glikoz konsantrasyonuna maruz kalan ve izole edilmiş kasların in vitro olarak glikoz ile inkübe edilmesinde, glikoz transport kapasitesinin geri dönüşümlü olarak değiştiği gösterilmiştir (Zierath ve ark 1994).

1.6.1. Sıçanlarda Deneysel Diyabet Modelleri

Metabolik bir hastalık olan DM' nin başlıca iki tipi olup bu hastalığın insanlar arasında yaygınlığı giderek artmaktadır. Tip I ve II olarak adlandırılan bu iki tip diyabetten ikincisi daha yaygın olarak gözlenmektedir. Her iki tip diyabet, hücre içi glukoz dengesinin (homeostasis) bozulması sorununu ortak olarak paylaşmalarına karşın aralarında önemli bazı farklar vardır. DM' nin I. tipinde sorun kaynağı yeterli miktarda insülin salınmaması iken ikincisinde insüline karşı bir direnç oluştuğu gözlemlenmektedir (Haris ve Zimmet 1992).

Diyabetin neden olduğu komplikasyonların incelenmesinde ve bunların tedavi örneklerinde deneysel olarak gerçekleştirilen diyabet modelleri önemli yer

tutmaktadır. Ayrıca DM ile elde edilen avantajlar ve uygulama örneklerine bakıldığında bu modellerin çok daha önemli olduğu görülmektedir.

Deneysel diyabet başlıca dört ayrı yolla gerçekleştirilmektedir: (1) cerrahi diyabet, (2) kimyasal diyabet, (3) kendiliğinden diyabet, (4) viral diyabet. Bunlar arasında en yaygın olanı kimyasal ajanlarla (streptozotocin ve alloxan gibi) diyabet yapılmasıdır. Bunlardan alloxan (ALL) seçici olarak pankreastaki beta hücrelerine doğrudan toksik etki yapmaktadır (Dunn ve ark 1943). Bu toksisitenin hücresel geçirgenliğin artmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Watkins ve ark 1964, Idahl ve ark 1976, Weaver ve ark 1978). Alloxan ile oluşturulan diyabetlerde diyabetin hemen hemen tüm komplikasyonları gözlenebilmektedir.

Rakieten ve arkadaşları ilk kez 1963 yılında streptozotocin (STZ) intravenöz olarak verdiklerinde diyabet oluştuğunu gözlemişlerdir. Streptozotocin de ALL gibi diyabeti, direk olarak pankteastaki beta hücrelerini etkileyerek oluşturmaktadır. Bilinenler ışığında ileri sürülen olaylar zinciri aşağıdaki şekilde özetlenebilir: Streptozotocin karbonyum iyonu oluşmasına, bu ise DNA alkilasyonuna sebep olmaktadır. DNA tamiri poly-ADP-ribose aktivasyonuyla sağlanmakta ve reaksiyon çok miktarda NAD'ye ihtiyaç duymaktadır. Streptozotocin enjeksiyonu hücrede aynı zamanda hızlı bir NAD düşüşüne, bu ise sonuç olarak hücrenin ölümüne neden olmaktadır. Streptozotocin insüline bağlı diabetus mellitus (IDDM) oluşturmak için, en çok kullanılan kimyasal ajandır. Streptozotocin ile diyabet oluşturulmuş hayvanlarda (kobay hariç) gözlenen başlıca komplikasyonlar; kardiyomiyopati, gastroenteropati, otonomik nöropati, arterial patolojiler koroner arter patolojileri, hepatik patolojiler, trakea patolojileri ve bağ dokusu hasarlarıdır. Streptozotocin ile oluşturulan diyabette insülin tedavisine gerek yoktur (Bonner-Weir ve ark 1981).

1.6.2. Deneysel Diyabetik Kardiyomiyopati

Diyabetik kardiyomiyopati olarak tanımlanan ve özel bir tip kardiyomiyopati olan hastalık, diyabetes mellituslu insanlarda geç bir komplikasyon olarak ortaya çıkmaktadır. Deneysel metodlarla diyabet yapılmış sıçanlarda bu patolojinin primer olarak kalp hücrelerindeki mekanik, biyokimyasal ve morfolojik değişimlerden kaynaklandığı ve bunlarda aterosklerotik değişikliklerin rolünün olmadığı

gösterilmiştir (Fein ve ark 1980). Esas olarak kardiyomiyopati kardiyak aritmi oluşmadan beliren ventriküler fonksiyon bozukluğuyla kendini belli eder. Bu bozukluklar, ventriküler kasılma kuvvetinde azalma, uzamış gevşeme evresi ve ventrikülere yeteri kadar kanın dolamaması olarak tanımlanmaktadır. Deneysel yolla diyabet yapılmış sıçanlarda, bu bulgular kalbe yüklenim sırasında daha da belirgin olmaktadır (örneğin; egzersiz sırasında) (Ayaz M, 9, 2004).

Streptozotocin enjeksiyonu sonrası görülen ölümler konjestif kalp yetmezliği ile orantılı olmaktadır. Sıçanlar ateroskleroz gelişimine göreceli olarak dayanıklı olduklarından STZ kombinasyonu ile yapılan diyabet sonunda oluşan kardiyak patolojinin diyabetik kardiyomiyopatiye benzediğine inanılmasına karşın (Öztürk ve ark 1996) altında yatan biyokimyasal olaylar tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmalar ışığında kardiyomiyositlerde gözlenen değişimlerin mekanizmasına ilişkin bilgiler şu şekilde özetlenebilir;

Elektrofizyolojik Değişiklikler: STZ ile yapılan deneysel diyabetik hayvan model çalışmaları ile ilk kez 1980 yılında Fein ve arkadaşları, toplam AP süresinin uzaması, kasılma ve gevşeme hızlarının ($\pm dT/dt_{max}$) azalması ve ventriküller AP genliğinin azaldığını rapor etmişlerdir. Ancak diğer araştırmacılar diyabetik sıçan ventrikül hücrelerinin dinlenim zar potansiyelinde ve maksimum depolarizasyon hızında bir değişme gösteremezken, AP süresindeki uzamayı gözlemişlerdir (Magyar ve ark 1992).

Diyabetli hayvan kalbi ventrikül bölgesinden izole edilen hücrelerden yapılan kayıtlarda da AP sürelerinin uzadığı ve dinlenim zar potansiyelinin değişmediği gözlenmiştir (Shimoni ve ark 1994, Ayaz ve ark 2004). Repolarizasyon evresindeki bu uzamadan zarı repolarize edici K^+ akımlarının sorumlu olduğu gösterilmiştir. Değişik tipleri bulunan bu K^+- akımlarından I_{K1}'da hiçbir değişiklik gözlenmezken, Ito ve Iss akım yoğunluklarının azaldığı gözlenmiştir (Shimoni ve ark 1998, 1999).

Hücre içi Serbest Ca^{+2} Homeostazındaki Değişiklikler: Diyabet oluşumundan sonra miyokardiyal Ca^{+2} metabolizmasının bozulduğu, SR tarafından Ca^{+2}'un geri alınımının ise azaldığı görülmüştür (Ganguly ve ark 1983, Lopaschuk ve ark 1983). Buna bağlı olarak diyabetik sıçanlarda $[Ca^{+2}]_i$ florometrik boyalarla yapılan

ölçümlerinde $[Ca^{+2}]_i$'daki değişme süresinin (transientlerin çıkışları ve inişleri) uzadığı bildirilmiştir (Choi ve ark 2002). Bu uzamanın altında yatan mekanizmayı açıklamaya yönelik çalışmalardan elde edilen sonuçlar: (1) ryanodin reseptör protein miktarında azalma (Netticadan ve ark 2001), (2) SR Ca^{+2}-ATPaz protein miktarında ve Ca^{+2} geri alınım aktivitesinde azalma (Choi ve ark 2002, Ganguly ve ark 1983, Lopaschuk ve ark 1983), (3) fosfolamban protein miktarında artış ama fosforilizasyon yetisinde azalma (Choi ve ark 2002), (4) SR Ca^{+2} depolama yetisinde azalma (Choi ve ark 2002), (5) ne I_{CaL} ne de kanal protein miktarında bir değişim olmaması (Choi ve ark 2002) şeklinde özetlenebilir.

1.7. Nerium Oleander

Zambakgiller (Apocynaceae) familyasında yer alan zakkum (lat. Nerium oleander), batıda, güney Portekiz' den başlayarak bütün Akdeniz sahilleri boyunca Suriye'de, Batı ve Güney Anadolu'nun dere yataklarında yetişir. Yazın çiçeklenen ve uzun bir çiçeklenme devresine sahip olan zakkumun meyvesi bakla şeklindedir. Dozuna bağlı olarak zehirli olduğundan insan ve hayvanlar için tehlikelidir. Yaklaşık 15 yıl önce Dr. Ziya Özel tarafından kanser tedavisinde kullanımı ile gündeme gelen Nerium oleander'in halen ABD' de Faz I klinik denemeleri sürdürülmektedir (Smith ve ark 2001, Erdemoğlu ve ark 2003).

Ülkemizde "zakkum, ağı çiçeği, kan ağacı zıkkım ağacı" olarak da bilinen Nerium oleander' in farklı kısımları Akdeniz havzasının farklı kesimlerinde halk arasında ödem, lepra, göz ve deri hastalıklarında kullanılmaktadır. Yapraklarında bulunan kardiyotonik içeriğin antibakteriyel, antikanser, kanama-pıhtılaşma zamanı ve merkezi sinir sistemi üzerindeki etkileri değişik araştırmalara konu olmuştur (Manjunath 1966, Nadkarni 1976, Nasir ve Ali 1982, Begum ve ark 1999, Zia ve ark 1995).

Bitkinin farklı kısımlarının incelenmesi sonucunda değişik glikozitler, triterpenler ve uzun zincirli bileşiklerin varlığı ortaya konmuştur (Siddiqui ve ark 1995, Begum ve ark 1999, Zia ve ark 1995).

Nerium oleander' in parçalanmış yapraklarının su ekstresinde % 2.3 oranında polisakkarit bulunur, bileşime giren polisakkaritlerin % 67' si galakturonik asit, ramnoz, arabinoz ve galaktoz' dan oluşur (Muller ve ark 1991, Zia ve ark 1995). NO'in taze ve kurutulmuş yapraklarının metanol ekstraksiyonu ile elde ettikleri fraksiyonlarının analjezik etkilerinin bulunduğunu belirtmişlerdir.

1.7.1. Nerium Oleander' in Biyolojik Sistemlerdeki Önemi

Nerium oleander' in insan ve hayvan kalbi üzerinde pozitif inotropik etki potansiyeli bulunmaktadır. Oleander kardenolidlerin bu etkisi fizyolojik etki kalıbı açısından klasik dijital glikozitlerde olduğu gibi plazmalemmadaki Na^+/K^+ ATPaz inhibisyonuna benzer. Ancak oleander ve dijital kardenolidler, toksisiteleri ve ekstrakardiyak etkileri açısından farklıdır (Langford ve Boor 1996).

Nerium oleander yapraklarında metanol ekstraksiyonu sonrasında izole ettikleri kardenolid grubu maddelerin farelerde 50 mg/kg dozdaki kullanımları ile merkezi sinir sistemi (MSS) depresyonu oluştuğunu ifade etmişlerdir (Siddiqui ve ark 1997, Begum ve ark 1999). Araştırmacılar, taze Nerium oleander yapraklarının metanol ekstresinde belirledikleri kardenolid grubu 4 maddenin (neridiginoside, nerizoside, neritaloside ve odoroside-H) farelerde 25 mg/kg dozda MSS depresyonu oluşturduğunu belirtmiştir. Nerium oleander' in köklerinde ise proceragenin ve neridienone gibi steroid yapılı maddeler bulunur (Huq ve ark 1999).

Nerium oleander yapraklarında bulunan diğer bir madde grubu triterpenlerdir. Genellikle etilasetat ekstraksiyonu ile elde edilen bu maddeler tarakasterane ve ursane tiptedir. Nerium oleander bileşimine giren triterpen grubu maddelerin identifikasyonu ve biyolojik etkinliklerine yönelik çalışmalarda in vitro antiinflamatuvar ve antikanser etkilerinin mevcudiyeti değerlendirilmiştir.

Oleandrin Nerium oleander yapraklarında bulunan temel maddelerden biridir. İn vivo koşullarda gerçekleştirilen bir araştırmada (Afaq ve ark 2004),

antiinflamatuvar ve tümör hücresi gelişimi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, 2 mg oleandrinin proflaktik amaç ile lokal uygulamasının, deri tümörü oluşumunda yaygın olarak kullanılan bir madde olan TPA (l2-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)' nın etkisine karşı olumlu sonuçlar elde edildiğini ifade etmişlerdir.

Ülkemizde Nerium oleander'in alkolde uzun sure bekletilmesi ile elde edilen formu alt ekstemite ağrılarında ve paraliz olgularında kullanılmaktadır. Ayrıca yağda bekletilmesi sonrasında elde edilen formunun ise romatik eklem ağrılarında kullanıldığına ilişkin veriler vardır (Yesilada 2002). Yaprak veya çiçeklerin ağrılı durumlarda ve egzemada, taze yapraklardan elde edilen bitki özsuyunun ise apse ve romatizmal olgularda kullanımına ilişkin kayıtlar mevcuttur (Erdemoglu ve ark 2003). Suudi Arabistan' da ise Nerium oleander' in meyveleri ve bitkinin özsuyu antiromatizmal olarak ve deri hastalıklarında kullanılmaktadır (Adam ve ark 2001).

Nerium oleander' in su ve etanol ekstresinin farelerde p-benzokuinon ile oluşturulan abdominal kasılmaları önemli oranda azalttığı (antinosiseptiv etki) ve karrageenan ile arka ayakta oluşturulan ödem modelinde önemli düzeyde antiinflamatuvar etkisinin olduğu belirtilmiştir. Ağrı denemelerinde bitkinin taze ve kurutulmuş çiçekleri ile yapılan uygulamalarda deneklerde gastrik ülserayonların görülmemesi dikkati çeken bir bulgu olarak izlenmiştir (Erdemoğlu ve ark 2003).

Nerium oleander' in alkol, su ve kloroform ekstrelerinin 10 mikroorganizmaya karşı (8 farklı bakteri ve 2 maya) antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmış; alkol fazı ürünleri sadece Bacillus cereus ve Psudomanas aeroginosa'ya karşı antimikrobiyal aktivite gösterirken, su ve kloroform fazı ürünlerinde çalışılan bakteri ve mayalara karşı antimikrobiyal aktiviteye rastlanılmamıştır (Çete ve ark 2005).

Anvirzel^{TM} (Nerium oleander'in steril filtre edilmiş, liyofilize sıcak su ekstresi)' in yapısında bulunan temel kardiyak glikozitler oleandrin, odorsid,

neritalosid ve aglikon oleandrigenin' dir. Farelerde Anvirzel^{TM}'in oral (80 µg/kg) uygulaması sonrasında oleandrin hızla absorbe olur (C_{max} 20 dk), eliminasyon dönemi yarılanma ömrü ($t_{1/2}$ β) 2.3±0.5 saat, oral absorbsiyon oranı ise % 30 düzeyindedir. Oleandrinin IV uygulaması sonrasında karaciğer düzeyi, kalp ve böbrek dokusuna göre yaklaşık iki kattır. Oleandrinin aglikon formu olan oleandrigeninde uygulama sonrasında dokularda oleandrin düzeyinin ortalama ½' si düzeyinde bulunur. Oleandrinin % 1.9' u, oleandrigeninin % 4.4' ü 24 saat içerisinde idrar ile atılır, dışkı ile atılım düzeyi ise daha yüksektir (her iki madde için % 66) (Ni ve ark 2002).

Temelde zehirli bir bitki olan Nerium oleander' den su ekstresi ile elde edilen Anvirzel^{TM}' in solid tümörlerde kullanımına yönelik olarak gerçekleştirilen Faz I çalışmalarında 1.2 mg/m2/gün dozunda IM yolla uygulamanın güvenli olduğu ifade edilmektedir. Uygulamalar sırasında enjeksiyon bölgesinde ağrı ve ayrıca yorgunluk, mide bulantısı ve dispne gibi belirtilerin izlendiği bildirilmiştir (Mekhail ve ark 2006).

Nerium oleander' in kurutulmuş yapraklarının alkoldeki letal olmayan dozunun (1000 mg/kg vücut ağırlığı) 9 hafta boyunca (haftada 1) dişi ve erkek farelere SC yol ile uygulanması sonrasında ağırlık kazancının (başlangıçtaki ağırlıklarına göre % oranı) baskılanma eğilimi belirlenmiştir. Belirlenen dozun birden fazla uygulanması miyokardiumda ve kan parametrelerinde (WBC, RBC, Hb, HCT, PLT) anlamlı değişime neden olmamıştır. Diğer yandan letal doz (4000 mg/kg BW) kalp durması ile sonuçlanan miyokardiyal elektriksel aktivitelere neden olmuştur (Haeba ve ark 2002). Kurutulmuş NO yapraklarının akut toksisitesi belirlemek amacı ile bir defalık (1 ve 0.25 mg/kg bw) ve günlük (0.06 g/kg bw) NO uygulanan Nadji koyunlarında tek dozluk ile yerinde duramama, çiğneme hareketleri, dispne, rumende gaz toplanması, hareketlerde koordinasyon bozukluğu ve kaslarda paresi; 4–24 saat sonra ölüm belirlemişlerdir (Ada ve ark 2001). Ölen hayvanların otopsilerinde hemoraji, siyanotik akciğerler, amfizem, kataral abomasitis ve enteritis dikkati çekmiştir. Günlük uygulanan NO' in ise daha hafif semptomlara neden olduğu ve ölümlerin 3–14. günlerde görüldüğü ifade edilmiştir. Otopside

hepatonefropati, renal pelvis ve mezenterde jelatinizasyon izlenmiştir. Biyokimyasal analizlerde ise AST ve LDH aktivitelerinde, bilürubin, kolesterol ve üre yoğunluklarında artış ve total protein ve albumin seviyelerinde ile azalma, anemi ve lökopeni ile görüldüğü bildirilmiştir.

1.7.2 Nerium Oleander ve Diabetes Mellitus İlişkisi

Yetiştiği bölgelerde ve ülkemizde farklı amaçlar ile kullanılan zakkumun antidiyabetik etkinliğine ilişkin yayınlar çok sınırlı düzeydedir. Araştırmacılar Fas' ta halk arasında kullanılan bitkisel maddelerin sınıflandırılmasında zakkumu antidiyabetik unsurlar arasında değerlendirmişlerdir (Bellakhdar ve ark 1991). Aynı bölgede farklı araştırmacı gruplar tarafından yapılan incelemelerde zakkumun antidiyabetik amaçlı kullanımına ilişkin bulgular yer almaktadır (Jouad ve ark 2001, Bnouham ve ark 2002, Eddouks ve ark 2002, Tahraoui ve ark 2006).

Diyetin düzenlenmesi, oral hipoglisemiklerin kullanımı ve insulin gibi NIDDM (non-insulin dependent diabetes mellitus) tedavisinde günümüzde kullanılan terapötik uygulamalar, kendi başlarına sınırlı bir etkiye sahiptirler. Birçok doğal ürün ve bitkisel ilaç uygulamaları diyabetin tedavisi için önerilmektedir. Yapılan çalışmalar Tip II diyabetik insan ve hayvanlarda bazı bitkisel özütlerin hipoglisemik etkilerini göstermektedir. Bitkilerden sağlanan bu ürünler glikoz metabolizmasını yeniden düzenlemek yolu ile hipoglisemik etki üretmenin yanı sıra lipid metabolizmasını ve antioksidan durumu iyileştirme şeklinde de olabilmektedir.

İnsülin direncine neden olan bir veya daha fazla faktörün uzaklaştırılması ve/veya engellenmesi bu konuda yapılan çalışmaların ana konusudur. Tip II diyabette tedavi ile ilgili araştırmalar bu açıdan önem arzetmektedir. Araştırmacılar ve klinisyenler diyabetteki kan glikoz düzeyinin düşürülmesi için, insülin yetersizliğini düzeltme, karaciğerdeki glikoz üretiminin azaltılması, mide bağırsak kanalından glikoz emiliminin geciktirilmesi, metabolik dengeyi düzeltme ve diyabetin gelişimi ile neden olduğu komplikasyonları önleyebilmek için çalışmalar yapmaktadırlar.

Bu çalışma ile Nerium oleander'in bu önemli etkileri göz önüne alınarak NO' in sıcak su distilatının liyofilize formda uygulamalarının diyabetik kardiyomiyopatik bulgular üzerinde olumlu etkilerinin elektrofizyolojik yöntemler ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Zakkum Ekstraktının Hazırlanması

Zakkum yaprakları, Nisan-Eylül döneminde Mersin bölgesinden toplandı. Taze toplanan zakkum yaprakları yıkandıktan sonra doğrayıcı ile doğrandı ve sıcak suda (100 g/1000 mL) kaynatılarak distilasyonu yapıldı. Elde edilen sıcak su distilatı liyofilizatörle (FDT-8618 Freeze Dreyer, Operon, Korea) liyofilize edildi.

2.2. Deney Hayvanları

Araştırmada 40 adet Sprague-Dawley sıçan (9-12 hafta) kullanıldı. Araştırma Etik kurul tarafından onaylandı (Necmettin Erbakan Üniversitesi Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Etik Kurul Komisyonu, Konya, rapor no: 2013-143). Hayvanlar polisulfon yapıdaki bireysel kafeslerde, (%60 atmosferik nem, 22±2 ^{o}C, 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık) barındırıldı. Sıçanlar araştırmaya dahil edilmeden önce iki hafta süresince ortama uyumları sağlandı. Yem ve su ihtiyaçları ad libitum sağlandı. Rasyon bileşimi ise kuru madde: % 89, ham protein: % 21, seluloz: en çok % 5, kül: en çok % 10, Ca: % 1–2, P: % 0,5–1, NaCl: % 0,5, ME: 2850 kcal/kg şeklinde oluşturuldu. İntibak aşamasını tamamlayan deneklerden bir hafta ara ile iki kez kan örneği alındı; açlık kan şekeri, total kolesterol, trigliserid, HDL ve LDL düzeyleri belirlenerek bazal lipid profilleri ortaya konuldu ve genel ortalamaya uygunluk göstermeyen hayvanlar araştırmadan çıkarıldı.

2.3. Tedavi Edici Uygulamalar

40 adet sıçan rastgele 4 eşit gruba ayrıldı. Tip II diyabet modeli oluşturmak için (3 gruba) iki hafta boyunca bileşimi çizelge 2.1.' de belirtilen ve metabolik enerjinin % 58'inin hayvansal yağ içeriğinden sağlandığı yüksek yağlı diyet ile beslendikten 2 hafta sonra streptozotosin sitrat bufferda çözdürüldü (pH 4.5), intraperitonal olarak STZ 35 mg/kg dozunda uygulandı. STZ injeksiyonundan bir hafta sonra tokluk kan şekeri seviyesi $\geq$ 300 mg/dl olanlar tip II diyabet olarak değerlendirildi (Srinivasan ve ark 2005). Kontol grubundaki sıçanlar ad-libitum beslendi ve sadece sitrat buffer solüsyonu uygulandı. Negatif kontrol grubu olan

diyabetik sıçanlar (DM) yüksek yağlı diyet ile beslendi ve STZ uygulandı. Bu gruba NO' ya eşdeğer oral serum fizyolojik içirildi. NO ile tedavi edilen diyabetik gruptaki (OZ) sıçanlar yüksek yağlı diyet ile beslendi ve STZ uygulandı. Aynı zamanda NO distilatı 375 μg / 0.5 ml. distile su formülasyonun da diyabet olduktan sonra 30. günden sonra 30 gün boyunca oral gavaj yöntemiyle içirildi. Profilaktik NO tip 2 diyabet grubundaki (POZ) sıçanlar yüksek yağlı diyetle beslendi ve STZ uygulandı. 375 μg / 0.5 ml. distile su formülasyonu diyabetin teşhisinden hemen sonra deney sonuna kadar NO oral gavaj şeklinde uygulandı.

Çizelge 2.1. Deney hayvanları için kullanılan yem içeriği.

YEM İÇERİĞİ	**%Oran**	**BESİN MAD.**	**RASYON**
BİTKİSEL YAĞ	3,00	KM,%	94,4
BUĞDAY UNU, BONKALİTE	-	HP,%	22,3
HAYVANSAL YAĞ	37,00	ME,kcal/kg	5387
MISIR, SARI	30,50	Ca,%	1,16
KAZEİN, KURUTULMUŞ	20,00	P,%	0,62
SOYA KÜSPESİ, %48	4,50	Na,%	0,21
DİKALSİYUM FOSFAT	1,70	Met+Sis,%	0,94
DL-METHİONİN	0,20	Lizin,%	1,81
KİREÇ TAŞI	1,60	HS,%	0,89
TUZ	0,50	HY,%	40,34
VİTAMİN-MİNERAL KARMASI	1,00	Linoleik a.%	3,40

2.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

Her bir grupta 10 hayvan olacak şekilde aşağıda belirtilen deney grupları oluşturuldu. Hayvanların barındırıldığı ortamın ışık, ısı ve nem düzeyleri kontrol altında tutuldu (12 / 12 saat ışık/karanlık–7:30/19:30, 22±2 ^{o}C, % 55±5 nem).

Sağlıklı Kontrol-Normal Diyet (KON): Lipid profili uygun olan ve herhangi bir uygulama yapılmayan 10 adet sağlıklı sıçandan oluşturuldu. Deney süresince normal diyet ile beslenmeleri sağlandı.

Diyabetik Negatif Kontrol (DM): Yukarıdaki açıklandığı şekliyle deneysel tip II diyabet modeli oluşturulan 10 adet sıçandan oluşturuldu. Hayvanlara deney süresince herhangi bir uygulama yapılmadı. Deney süresince yüksek yağlı diyet ile beslenmeleri sağlandı.

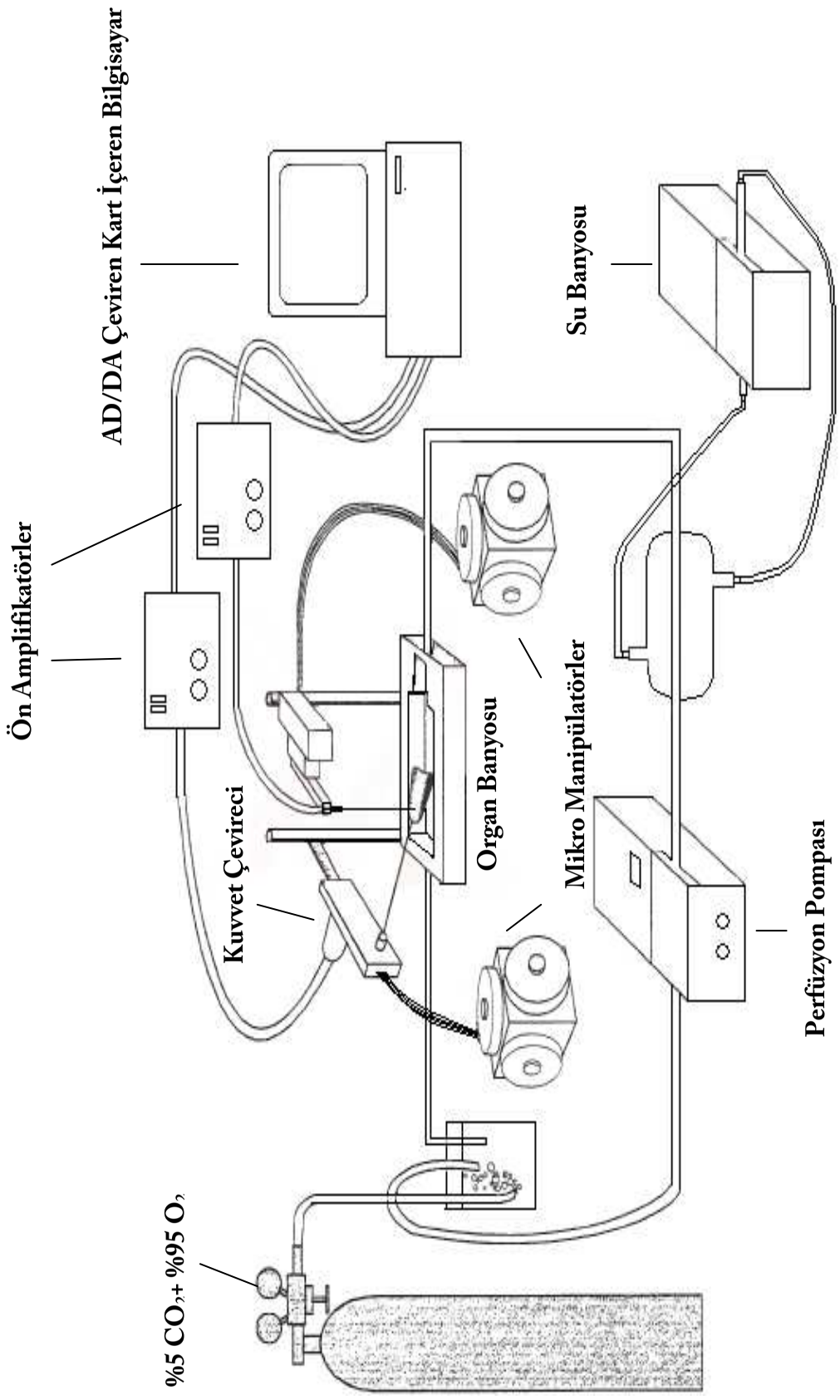
Diyabetik Zakkum 10 mL (OZ): Deneysel tip II diyabet modeli oluşturulan 10 adet sıçandan oluşturuldu. Diyabet oluşumu teyit edildikten sonra ki 30 gün boyunca deneklere herhangi bir uygulama yapılmaksızın mikro/makrovasküler bozuklukların oluşumu için beklendi. Takip eden 30 günlük dönemde ise hayvanlara orijinal NO distilatının 10 mL' sine karşılık gelen yoğunlaştırılmış 0.5 mL distilat gavaj ile günde bir kez uygulandı. Böylece, NO uygulamasının diyabete bağlı sekonder unsurlar üzerindeki tedavi edici etkinliğinin belirlenmesi amaçlandı.

Diyabetik Zakkum 10 mL (POZ): Deneysel tip II diyabet modeli oluşturulan 10 adet sıçandan oluşturuldu. Diyabet oluşumu teyit edildiği andan itibaren iki ay boyunca hayvanlara orijinal NO distilatının 10 mL' sine karşılık gelen yoğunlaştırılmış 0.5 mL distilat gavaj ile günde bir kez uygulandı. Böylece, NO uygulamasının diyabete bağlı sekonder unsurlar üzerindeki proflaktik etkinliğinin belirlenmesi amaçlandı.

2.5. Sol Ventrikül Papiller Kas Aksiyon Potansiyeli ve Kasılma Kayıtlarının Alınması

Deney süresinin sonunda sıçanlar, heparinli pentobarbital ile (30 mg/kg) anestezi altında iken (35 mg/kg ketamin, 5 mg/ kg ksilazin) kalpler hızlı bir şekilde çıkarılarak önceden gazlanmış (%95 O_2 ve % 5 CO_2 ile), soğuk ve düşük Ca^{+2} içeren içeriği (mM: 119 NaCl, 4,8 KCl, 1,0 $CaCl_2$, 1,2 $MgSO_4$, 1,2 KH_2PO_4, 20 $NaHCO_3$, 10 glikoz ve pH = 7,4) olan modifiye Krebs çözeltisi içerisine alındı. Yine aynı çözeltiyi bulunduran tabanı mum kaplı petri üzerine konan kalpler aort tabana gelecek şekilde iğne yardımıyla hem aorttan hem de kalbin apeksinden muma sabitlendi. Sol atriyum kesilerek, sol ventrikül duvarı hilal şeklinde açıldı. Herhangi bir fiziksel hasar verilmeden tek ucundan 6/0 ipek iplikle bağlanan papiller kas özel yapılan organ banyosu içine yerleştirildi (Şekil 2.1). Kas serbest olan ucundan iğne elektrotla banyo tabanındaki muma sabitlenirken diğer uç bir kuvvet çevirecine

(Grass FT03) bağlandı ve organ banyosu içinde sürekli dolanan (%95 O_2 ve % 5 CO_2) gazlanmış Krebs solüsyonu (mM: 119 NaCl, 4,8 KCl, 1,8 $CaCl_2$, 1,2 $MgSO_4$, 1,2 KH_2PO_4, 20 $NaHCO_3$, 10 glikoz ve pH = 7,4) ile sürekli perfüze edildi (37 ^oC'de). Kas örneklerinin dengeye gelmesi için 20 dakika beklendi ve daha sonra maksimum gerilme (kasılma) elde edilinceye kadar gerilen örnekler kayıt sistemimiz içinde entegre olan bir stimülatör (MP150) aracılığı ile kare biçimli eşik uyaranın 2 katı genlikli, 3 ms süreli ve 0,2 Hz frekansa sahip elektriksel uyaranlarla kasılmalar elde edildi. Sol ventrikül papiller kasından bir önceki paragrafta açıklanan şekilde kasılmalar kaydedilirken, semi-floating cam mikroelektrot (15-20 MΩ dirence sahip, 3M KCl ile doldurulmuş) ile Aksiyon Potansiyelleri (AP) kaydedildi. Mikroelektrot cam kapiller tüpler kullanılarak (P-1000 micropipette Puller Sutter Instrument USA) pipet çekicide hazırlandı. Kasılma ve tek hücre aksiyon potansiyelleri konvansiyonel MP150 kayıt ve analiz sistemi ile gözlem yapılırken eş zamanlı bilgisayarın hard diskine ileri analizler için kayıt edildi. Daha önceki deneyimlerimize bağlı olarak doku içine her bir dalış neticesinde ard arda elde edilen AP kayıtları arasında bir farklılık göstermediğinden, bu kayıtların ortalamaları kullanıldı. Her bir dalış için elde edilen ortalama AP kayıtları, tarafımızdan hazırlanan bir excel sayfası aracılığıyla analiz edilerek, maksimum depolarizasyon (MD) değeri, dinlenim zar potansiyelinin (RMP) değeri ve repolarizasyonun %25 (APD25), 50 (APD50), 75 (APD75) ve 90 (APD90)'a düşmesi için geçen süre gibi AP ile ilgili parametreler hesaplandı. Kasılma eğrilerinin ise, başka bir Excel sayfası kullanılarak maksimum gerim (PT), maksimum kasılmanın oluşması için geçen (TP) ve tepe değerin %50'ine ve %90'ına düşmesi (RT50 ve RT90) ve çıkması (CT50) için geçen süre gibi parametreler ölçüldü.



Şekil 2.1. Eş zamanlı olarak aksiyon potansiyeli ve kasılma kayıtları için kullanılan deney düzeneği şeması.

2.6. Kan Biyokimyasal Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Her hayvanın haftalık vücut ağırlıkları not edildi. Deney boyunca 30 gün aralıklarla bütün sıçanların kuyruk veninden kan örnekleri alındı. Kanlar santrifüj (3000g, 10 dk) edilip serumları ayrıldı. Serum örneklerinden kan glikoz, aminotransferaz (AST), kolesterol (KOLE) ve trigliserit (TG) ticari kitlerle (ILAB TestTM, Instrumentation Laboratory, Milano, Italy) analiz edildi.

2.7. Histopatolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

Kalp kesitleri serum fizyolojik ile yıkanarak kan ve pıhtıdan arındırılıp %10 luk formaldehide konuldu. Kalbin 4 bölümü de sagital kesitler yapılarak incelendi. Örnekler gece boyunca parafinde bırakıldı. 4 mikron kalınlığındaki bölümler halinde kesitler alındı ve rutinde ışık mikroskobunda morfolojik değerlendirilmesi için hematoksilen eozin ile boyandı. Morfolojik değerlendirme kriterlerine göre ekstra histokimyasal ve imminohistokimyasal boyamalar yapıldı.

Başlıca morfolojik kriterler ve değerlendirme:

Miyosit temas kaybı: Bu aslında kardiyomiyosit çapının azalmasından dolayı ve bireysel kardiyomiyosit fibrillerin arasındaki iletişim azalması gözlenir. Patolojik değişikler +1, +2, +3 olarak derecelendirildi. Eğer bu morfolojik değişiklik bütün doku yüzeyinin % 10 olduğunda +1, %11-25 arasında ise +2, %26 ve daha fazla ise +3 olarak değerlendirildi.

Miyosit nekrozu: Bu parametre koagulasyon nekrozu ya da polimorfnükleer lökositler ve lenfositler ile çevrili alanlar olarak tanımlanır. Bir önceki bölümdeki parametreler benzer şekilde skorlama yapılmıştır. Patolojinin durumuna göre bir odak var ise fokal (F) ve birden fazla odak var ise multifokal (MF) olarak kısaltmalar kullanılmıştır.

Miyokardiyal skar: Bu parametre 500 mikron çapından büyük miyokardiyumdaki fibrozis alanlarını tanımlar ve fibrozisin varlığı ya da yokluğu olarak belirtilmiştir.

Fibrozisin yer değiştirmesi: Ölü miyozis alanlarının yeni fibrotik doku ile yer değiştirmesini belirtmektedir. Bu alanlar var/yok ve fokal/multifokal diye değerlendirilir.

İnterstisiyel fibrozis: Masson Trichrome boyasıyla görülen fibril kardiyak miyosit arasındaki ince şeritlerin kollajen birikmesidir. Bir bölgede gözlenen odak hafifçe boyanan kollajenin ince iplikleri ise +1 olarak tayin edildi; daha koyu boyanan kollajen lifler, +2 olarak belirtilmiştir.

Z çizgisi bozulması: Bu parametre miyofibril dejenerasyona bağlı olarak Z hattının doğrusallığının bozulması olarak tanımlanır. Patolojik değişimi göstermek için toluidine blue boyası ve connexin imminohistokimyasal boyamaya yapıldı. İlk aşamada aynı yüzey alanı kaç patolojik odak olduğu yüzde oranı ile değerlendirildi.

Sitoplazmik vakuolizasyon: İntrasitoplazmik olarak mikro veya makro vakuollerin varlığı olarak değerlendirildi. İlk aşamada aynı yüzey alanı içinde kaç tane vakuolün olduğu değerlendirildi.

2.8. İstatistiksel Analiz

Ölçülen parametrelerin verileri ortalama ± standart hata şeklinde yazılmıştır. Belirlenen parametreler arasındaki istatistiksel farklılıklar SPSS 10.0 (SPSS for Windows, SPSS Inc., Chicago, Il., USA) istatistik paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi yapıldı. Aksi belirtilmedikçe istatistiksel anlamda önemlilik sınırı olarak $P<0.05$ kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Deney Hayvanlarının Genel ve Biyokimyasal Parametrelerinin İncelenmesi

Deney gruplarının vücut ağırlıkları ve kan glikoz seviyeleri çizelge 3.1.' de özetlenmiştir. Bütün çalışma grubu hayvanları deney süresince ağırlık kazanmıştır. Diyabetik grupların (DM, OZ ve POZ) kan glikoz seviyeleri kontrol (Kon) grubu hayvanlarına göre kayda değer bir artış göstermiştir. Ancak çizelge 3.1.' de görüldüğü gibi, NO ile diyabetik grupların tedavisinde, kan glikoz seviyesi üzerinde herhangi bir pozitif etki meydana gelmemiştir. Deney süresi sonunda ölçümlenen biyokimyasal sonuçlar çizelge 3.2.' de özetlenmiştir. Diyabet süresince anlamlı artış gösteren AST, KOLE, TG değerleri, OZ ve POZ uygulamaları sonucunda kontrol seviyesine yakın değerler aldığı çizelge 3.2.' de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Deney hayvanlarına ait genel karakteristik değerleri. Çizelgede, Kontrol (KON), tip II diyabetik (DM), oral Nerium oleander (OZ) ve profilaktik Nerium oleander uygulanan (POZ) deney grubu hayvanlarının verileri görülmektedir. Çizelge içerisinde yer alan V. A. ve K. Ş. kısaltmaları sırası ile vücut ağırlığı ve kan şekeri değerlerini temsil etmektedir. * başlangıç grubu verilerine göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$). $^{\alpha}$ kontrol grubu verilerine göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$). Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir.

	V. A. (g)		**K. Ş. (mg/dL)**	
	Başlangıç	**Son**	**Başlangıç**	**Son**
KON (N=10)	231,17±5,85	353,83±7,98*	99,33±3,63	100,17±4,39
DM (N=10)	229,31±5,56	331,00±6,72*	443,00±35,33$^{\alpha}$	435,00±23,87$^{\alpha}$
OZ (N=10)	232,86±7,24	346,86±9,55*	497,50±32,48$^{\alpha}$	393,67±26,56$^{\alpha}$
POZ (N=10)	240,85±9,39	340,83±12,56*	466,45±25,60$^{\alpha}$	385,33±24,23$^{\alpha}$

Çizgelge 3.2. Deney hayvanlarına ait biyokimyasal ölçüm sonuçları. Çizelgede, Kontrol (KON), tip II diyabetik (DM), oral Nerium oleander (OZ) ve profilaktik Nerium oleander uygulanan (POZ) deney grubu hayvanlarının verileri görülmektedir. Çizelge içerisinde yer alan AST, KOLE ve TG kısaltmaları sırası ile aspartat aminotransferaz, kolesterol ve trigliserit değerlerini temsil etmektedir. $^{\alpha}$ kontrol grubu verilerine göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$). $^{\beta}$ diyabetik grubu verilerine göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$). Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir.

	AST	**KOLE**	**TG**
KON (N=10)	117,67±2,92	102,67±3,30	43,17±2,45
DM (N=10)	153,60±6,26$^{\alpha}$	129,29±8,96$^{\alpha}$	246,14±97,10$^{\alpha}$
OZ (N=10)	90,29±4,53$^{\beta}$	99,71±7,41$^{\beta}$	124,43±19,25$^{\alpha,\beta}$
POZ (N=10)	88,67±5,67$^{\beta}$	99,83±2,88$^{\beta}$	92,17±15,18$^{\alpha,\beta}$

3.2. Histopatolojik Parametrelerin İncelenmesi

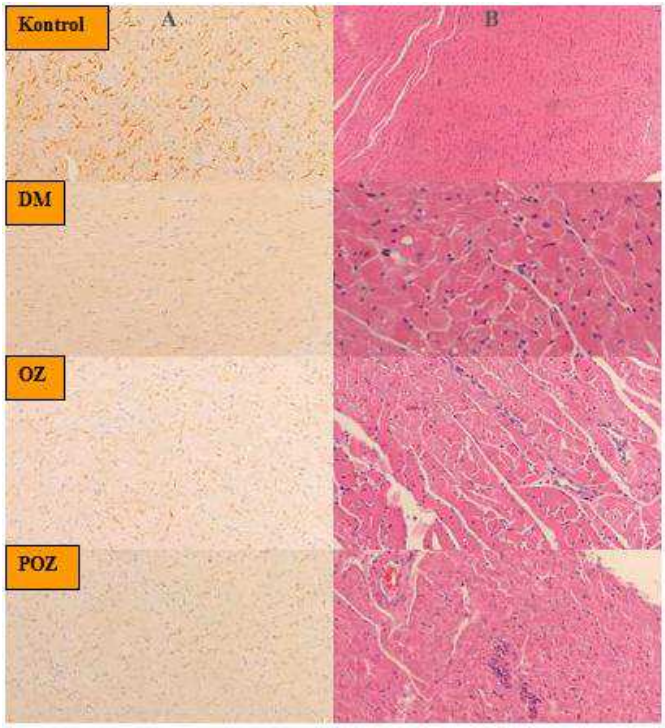
Histopatolojik bulgular çizelge 3.3.' de belirtilmiştir. Diyabetik grupta interstisiyel fibrozis, Z çizgisinde bozulma ve sitoplazmik vakuolizasyon parametreleri dışında 7 denekte de bütün patolojik morfolojik kriterler gözlenmiştir. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, bu parametrelerde +1 seviyesinde skorlanmış değişiklik ve bozukluklar gözlenmiştir. İnterstisiyel fibrozis ve sitoplazmik vakuolizasyon alanlarında da değişiklik gözlenmiş fakat yüzey boyutu küçülmüştür. Diyabetik gruplarla karşılaştırıldığında, OZ grubundaki bütün sıçanlardan elde edilen verilerde Z çizgisinde değişiklik görülmüş fakat değişiklikler yaygın değil sadece odaksal olmuştur. Sitoplazmik vakuolizasyon parametreleri OZ grubunda 2 denekte en küçük boyutta ve ayrıca 1 denekte miyosit temas kaybı, 4 tanesinde miyosit nekrozu, 1 denekte ise fibrozis alanlarında değişiklik görülmüştür. POZ grubu, OZ ve DM gruplarıyla karşılaştırıldığında sitoplazmik vakuolizasyon, miyosit temas kaybı, miyosit nekrozu, Z çizgisinde bozulma ve interstisiyel fibrozis alanlarında düzelme görülmüştür. Z çizgilerindeki degişiklikler POZ ve OZ gruplarında aynı ve bu parametre diyabetik grupla karşılaştırıldığında OZ grubunda iyileşmenin olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Deney hayvanları kalp dokularının morfolojik karakteristiği. Çizelgede, Kontrol (KON), tip II diyabetik (DM), oral Nerium oleander (OZ) ve profilaktik Nerium oleander uygulanan (POZ) deney grubu hayvanlarının verileri görülmektedir. Çizelge içerisindeki + ve – işaretler ilgili parametrenin varlığı veya yokluğunu temsilen kullanılmıştır. Çizelge içerisindeki rakamlar toplam deney hayvanı sayısında kaç deney hayvanı için o değerin görüldüğünü ifade etmek üzere kullanılmıştır. Ek olarak çizelge içerisindeki f ve mf kısaltmaları tek veya çoklu odakta belirlenmeyi temsilen kullanılmıştır.

	KON (N=6)		**DM (N=7)**		**OZ (N=7)**		**POZ (N=7)**	
Parametreler	**1+**	**2+**	**1+**	**2+**	**1+**	**2+**	**1+**	**2+**
Miyosit temas kaybı	-	-	7	-	1	-	2 (f)	-
Miyosit nekrozu	2 (f)	-	7 (mf)	-	3 (f)	1 (mf)	2 (f, mf)	-
Fibrozisin yer değiştirmesi	-	-	7 (+)	-	(1)	-	-	-
İnterstisiyel fibrozis	-	-	3	-	-	-	2 (f)	-
Vasküler skleroz	-	-	7 (+)	-	-	-	-	-
Perivasküler fibrozis	-	-	7	-	-	-	-	-
Z çizgisi bozulması	-	-	-	7	7 (f)	-	7 (f)	-
Sitoplazmik vakuolizasyon	3 (f)	-	3(mf) 2(f)	2	2 (f,mf)		1 (mf)	-

Resim 3.1.’ de konneksin boyamasıyla patolojik değerlendirmeler hafif, orta ve şiddetli olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda bitişik miyofibriller arasında yaygın ve yoğun şekilde birleşik dişlere benzeyen yatay ve dikey konneksin boyanmaları gözlenmiştir. DM grubunda interkalat disklerde soluk ve seyrek konneksin ekspresyonları gözlenmiş ve bitişik kalp miyofibriller arasında yatay boyanma gözlenmemiştir. OZ ve POZ grupları komşu miyofibriller arasında ve NO’

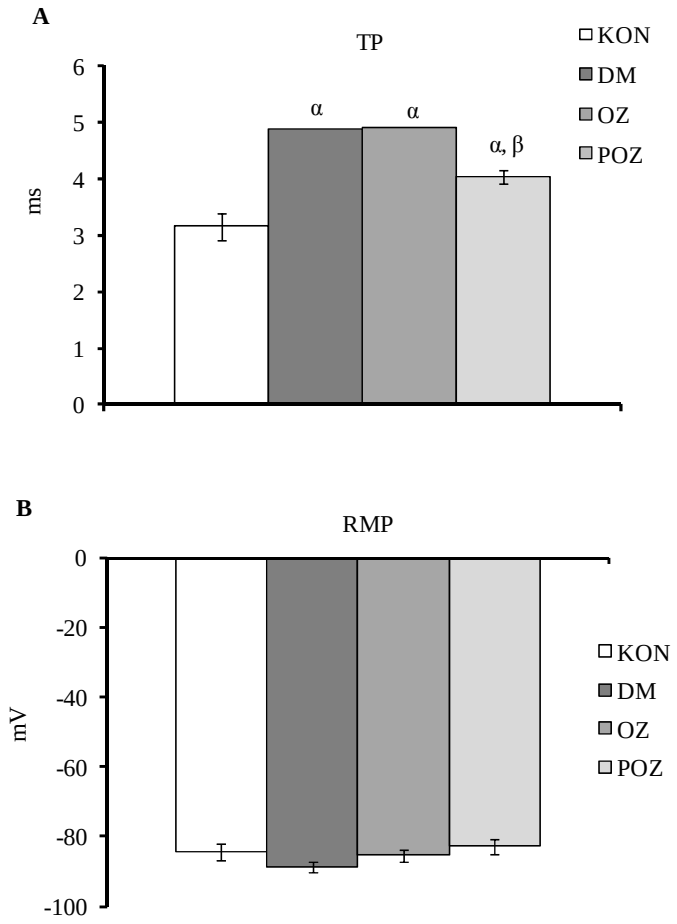
dan kaynaklanan önemli bir düzelme gözlenmiştir. NO' ya bağlı olarak interkalat disklerde hafif ve orta derecede yatay konneksin boyanması gözlenmiş ancak POZ ve OZ grupları arasında boyanma açısından bir farklılık gözlenmemiştir (Resim 3.1).



Resim 3.1. Çalışma grubundan alınan örneklerin immunohistokimya ile boyanma sonuçları - A sütunundaki örneklerin hepsi konneksin ile boyanmıştır. - B sütunundaki örneklerin hepsi Hematoxylin Eosin ile boyanmıştır.

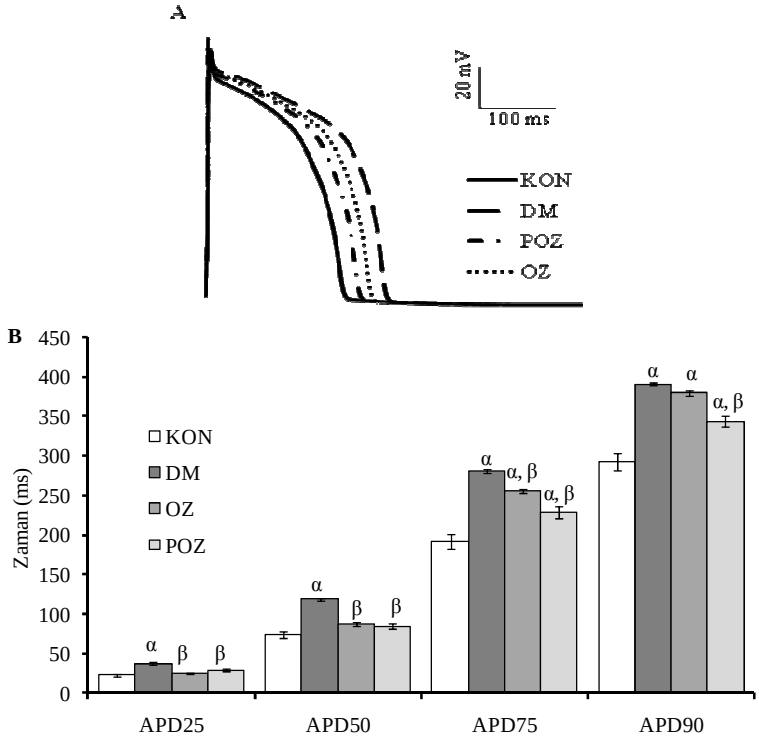
3.3. Nerium oleander Tedavisinin Aksiyon Potansiyeli Parametreleri Üzerine Etkisi

Deney süreci sonunda, hızla alınan papiller kasların uyarımla ilgili değerleri AP' lerin tepeye çıkış süreleri (TP) (Şekil 3.1A) ve ortalama dinlenim zar potansiyeli (RMP) (Şekil 3.1B) arasında değişiklik gözlenmemiştir. TP değerlerinin ortalamaları ölçüldüğünde (ms): KON= 4.90±0.07; DM= 4.89±0.16; OZ= 4.90±0.07; POZ= 4.90±0.09 bulunmuş ve RMP değerlerinin ortalamaları ölçüldüğünde (mV): KON= -84.39±2.24; DM= -88.58±1.51; POZ= -85.35±1.60; POZ= -82.68±2.18 olarak bulunmuştur.



Şekil 3.1. Deney hayvanlarından elde edilen aksiyon potansiyellerinin parametreleri. Şekilde Kontrol (KON), tip II diyabetik (DM), oral Nerium oleander (OZ) ve profilaktik Nerium oleander uygulanan (POZ) deney grubu hayvanlarının verileri görülmektedir. Panel A' da deney grubu hayvanlarına göre AP'lerin tepeye çıkış süreleri (TP) görülmektedir. Panel B' de ise ortalama dinlenim zar potansiyelleri (RMP) değerleri verilmiştir. $^{\alpha}$ kontrol grubu verilerine göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$). $^{\beta}$ diyabetik grubu verilerine göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$). Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir.

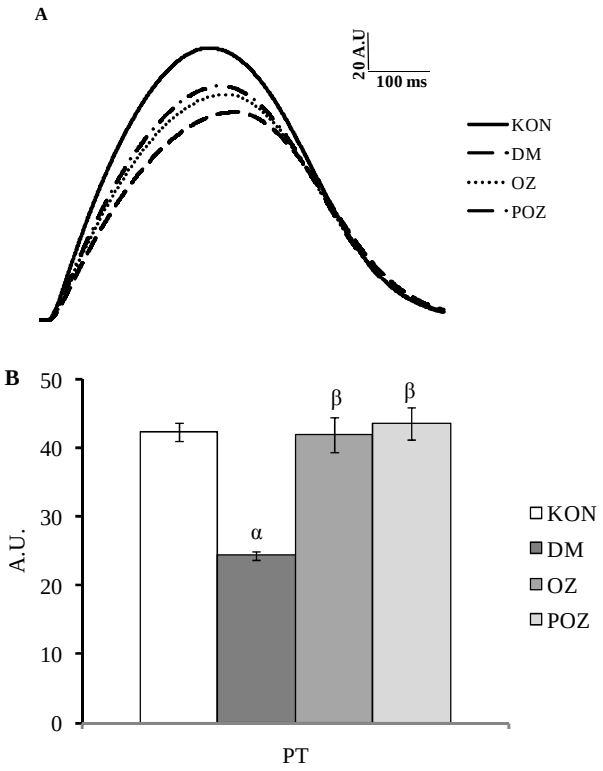
Hem diyabetik gruplarda hem de NO uygulamalarındaki etki zamanında olası repolarizasyon safhaları şekil 3.2.' de gösterilmiştir. Diyabetin hem koruyucu (POZ) hem de tedavi edici uygulamalarında (OZ) APD 25 ve 50 değerleri eski haline dönmüştür. OZ grubunun APD90 değerleri hariç, APD75 ve 90 değerleri NO uygulamalarıyla kayda değer olarak kısaldığı gösterilmiştir (Şekil 3.2B).



Şekil 3.2. Deney hayvanlarından elde edilen aksiyon potansiyellerinin parametreleri. Şekilde Kontrol (KON), tip II diyabetik (DM), oral Nerium oleander (OZ) ve profilaktik Nerium oleander uygulanan (POZ) deney grubu hayvanlarının verileri görülmektedir. Panel A' da deney grubu hayvanlarına ait birer örnek AP'ler aynı zaman ekseni üzerinde görülmektedir. Panel B' de AP'lerin repolarizasyonun %25, 50, 75 ve 90' ına düşmesi için gerekli olan zamanlar (APD25, 50, 75 ve 90) deney grupları için ortalama olarak verilmiştir. $^{\alpha}$ kontrol grubu verilerine göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$). $^{\beta}$ diyabetik grubu verilerine göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$). Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir.

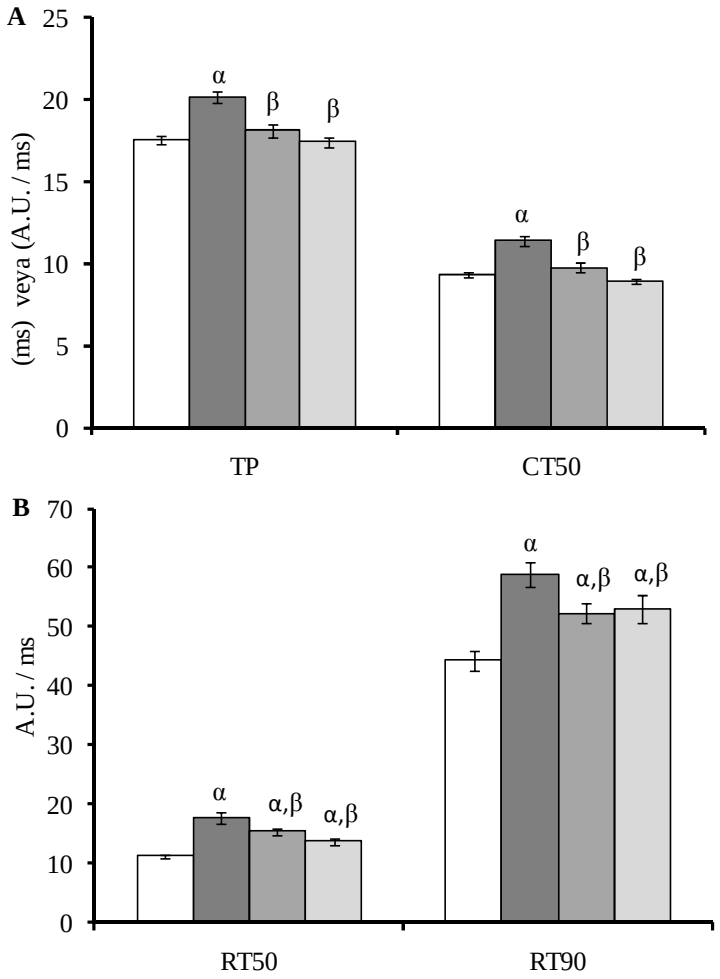
3.4. Kasılma Parametreleri Üzerine Nerium oleander Tedavisinin Etkisi

Şekil 3.3.' de papiller kasın mekanik aktiviteleri üzerine NO tedavisinin etkisi gösterilmiştir. Şekil 3.3B' de ise kasılmaların tepe değer (PT) ortalamalarını göstermektedir. Sonuç olarak, papiller kas şeritlerinin kasılma performansları diyabetik gruplarda kayda değer olarak azalmış ve NO ile tedavi edilen diyabetik grupların ortalama değerleri, kontrol grup değerleriyle benzer olduğu görülmüştür. Kasılma tepe değerlerinin azalması ile birlikte, PT diyabetik grupta daha büyük ve NO ile tedavi edilen diyabetik grupta kontrol grubuna yakın değerler aldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.3. Deney hayvanlarından elde edilen kasılma kayıtlarının parametreleri. Şekilde Kontrol (KON), Tip 2 diyabetik (DM), oral Nerium oleander (OZ) ve profilaktik Nerium oleander uygulanan (POZ) deney grubu hayvanlarının verileri görülmektedir. Panel A' da deney grubu hayvanlarına ait birer örnek kasılma kayıtları aynı zaman ekseni üzerinde görülmektedir. Panel B' de kasılmaların tepe değer (PT) ortalamaları verilmiştir. $^{\alpha}$ kontrol grubu verilerine göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$). $^{\beta}$ diyabetik grubu verilerine göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$). Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir.

Diyabetik grubun kasılma kinetiğinde (CT50) önemli bir artış gözlenmiş (Şekil 3.4A) ve her iki NO uygulaması ile diyabete bağlı değişiklikler kontrol grubuna benzer şekilde düzelttiği gözlenmiştir. Gevşeme kinetiği parametreleri (RT50 ve RT90) ise şekil 3.4B' de özetlenmiştir. Kasılma periyodunda olduğu gibi gevşeme periyodunda da diyabetik grupta artış gözlenmiş ve NO uygulaması bu olumsuz etkiyi tersine çevirmiştir. Fakat RT50 üzerine etkisi RT90' dan daha belirgin olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.4. Deney hayvanlarından elde edilen kasılma kayıtlarının parametreleri. Şekilde Kontrol (KON), tip II diyabetik (DM), oral Nerium oleander (OZ) ve profilaktik Nerium oleander uygulanan (POZ) deney grubu hayvanlarının verileri görülmektedir. Panel A' da kasılma fazına ilişkin ortalama tepeye çıkış süreleri (TP) ve tepe değerin % 50'sindeki türev ortalamaları (CT50) verilmiştir. Panel B' de ise gevşeme fazının % 50' si ve 90' ı için türev ortalama değerleri verilmiştir. $^{\alpha}$ kontrol grubu verilerine göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$). $^{\beta}$ diyabetik grubu verilerine göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($P<0.05$). Değerler ortalama ± SEM olarak verilmiştir.

4. TARTIŞMA

Diyabetik kardiyomiyopati, diyabetin tipinden bağımsız olarak, diyabette görülen sekonder bir komplikasyondur. Hastanın diyabete maruz kalma süresi arttığında, hastanın mortalite ve morbidite insidansı da artmaktadır. Kısa zamanda diyabetin sekonder komplikasyonları geliştiği için ve de uygulama kolaylığı nedeni ile deneysel diyabet modelleri sıklıkla tercih edilmektedir. Elektrofizyolojik açıdan bakıldığında diyabetik kardiyomiyopati, daha uzun aksiyon potansiyeli ve bozulmuş kasılma fonksiyonları ile karakterizedir. Tek miyosit aksiyon potansiyeli kayıtlarının alınması, tedavi stratejileri ve patolojik mekanizmaların altında yatan iyon kanallarının değerlendirilmesi açısından önemli ve faydalıdır.

Mevcut çalışmada, NO uygulamasının (koruyucu ve tedavi edici amaçla) tip II diyabetin indüklediği kardiyomiyosit disfonksiyonu ve lipid profilindeki değişiklikleri önlediği ilk defa gösterilmiştir. Trigliserid ve kolesterol seviyesindeki artış gibi birbirini destekleyen faktörler hastada kardiyovasküler komplikasyon riskini arttırmaktadır. Klasik tedavi içerisinde ilaç tedavisi sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Diyabetik kardiyak disfonksiyon üzerine lipid profili düzelmesi üzerinden sağlanan bu olumlu gelişmenin altında yatan mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. ancak azaltılmış düşük trigliserid seviyesinin kalp üzerinde pozitif inotropik etkisinin olduğu bilinmektedir (Howarth ve ark 2011).

Nerium oleander ekstraktı güçlü bir terapötik ajandır (OZ grubunda) ve diyabetteki aksiyon potansiyelinin uzamış repolarizasyon fazının (RP) kısalmasına neden olmuştur. (APD25;50;75 ve 90). Bu etkinin repolarizasyonun erken fazında daha belirgin (APD25 and 50) olduğu belirlenmiştir.

APD25 ve ADP50' de aksiyon potansiyeli fazları sırasıyla kardiyak I_{to} ve L tipi kalsiyum kanal akımlarının miktarına bağlı olarak değişir. Bu fazlardaki uzama kardiyak I_{to} da baskılanma ve/veya L tipi kalsiyum kanal akımlarında artma olduğu zaman görülür. Deneysel diyabete bağlı olarak kardiyomiyositlerdeki değişikliği gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Nayler ve ark 1973, Shimoni ve ark 2006, Pereira ve ark 2006, Howarth ve ark 2011).

Sağlıklı kardiyomiyositlere kardiyak glikozitlerin uygulanması sadece APD' nin kısalmasına değil ayrıca kalsiyum kanal akışının da azalmasına neden olduğu bilinmektedir (McDonald ve ark 1975, Ruch ve ark 2003).

İnsan ve model çalışmalarında diyabet modellerinde kalsiyumun hücre içine girişinin azalması kasılmasının da bozulmasına neden olduğu iyi bilinen bir durumdur (Belke ve ark 2004, Shimoni ve ark 2005, Ayaz ve ark 2006).

Diyabet çalışmamızdaki kasılma gücünün azalması, tepe değerine ulaşması için geçen sürenin uzaması, hem kasılma hem de gevşeme kinetiğinin artması bize diyabetik kardiyomiyopati modelimizin doğruluğuna olan inancımızı arttırmaktadır. NO'in tedavi ve koruyucu uygulanması gruplarda kasılma gücü ve kasılma kinetiğinin tamamen normale dönmesine neden olmuştur. Bu uygulama ile kasılmanın gevşeme periyodunda olumlu etkiler ve diyabetin değiştirdiği kalsiyum salınım ve alınım mekanizmasını tersine çevirdiği de gözlenmiştir. Kalp glikozitleri ile tedavi boyunca değiştirilebilir kalsiyum dağılımındaki artış hücre içi kalsiyumun yeniden dağılımına, diğer bir deyişle bağlı kalsiyumun mobilizasyonuna neden olmuştur (Lee ve ark 1971). NO uygulamasının diyabete bağlı oluşan değişiklikleri düzeltmesindeki bir diğer olasılık da miyokardiyal kalsiyum içeriğini azaltması aracılığı ile yapılabileceğini düşündürmüştür (Holland ve ark1954, Nayler ve ark 1973).

Diyabetin indüklediği değişiklikler üzerine NO tedavisinin pozitif etkisi nükleer faktör kappa B (NF-κB) aktivasyonu ile de açıklanabilir. Tip II diyabet boyunca, NF-κB gen ve protein ekspresyonu mitokontride artmış ve buna bağlı kardiyomiyositlerde oksidatif stres artmıştır. NF-κB blokörü tedavisiyle mitokondriyel oksidatif stres azaltılmış ve kardiyak NF-κB aktivitesini düzenleyerek kardiyak disfonksiyona karşı korumuştur (Mariappan ve ark 2010).

Oleandrin doku türünden bağımsız olarak NF-κB aktivasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (Sreenivasan ve ark 2003). İmmünohistokimyasal sonuçlarımızla uyumlu bir şekilde diğer etkilerin yanı sıra (antikarsinojenik, antiinflamatuvar), diyabetin indüklediği değişiklikler üzerine yapısal düzelmelere de neden olmuştur.

Fizyolojik hücre hasarı durumlarında transaminazların plazma seviyesinin artması temel bir göstergedir. Transaminazlar arasında yer alan AST seviyesinin artması kalp hasarının bir belirteci olabilir. Bizim AST sonuçlarımızda buna paralel olarak diyabette kalp hasarı durumunda artış göstermiştir. İmmunohistokimyasal sonuçlarımızla uyumlu olarak NO uygulanan gruplarda AST seviyesinin düştüğü görülmüştür.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Mevcut araştırma sonuçları NO distilatının hem tedavi hemde koruyucu amaçlarla uygulanmasının diyabetin indüklediği negatif değişiklikler üzerine pozitif etkili olduğu gösterilmiştir. Bu olumlu etkilerin moleküler mekanizmasını açıklamaya yönelik üç farklı yolağı aydınlatıcı nitelikteki araştırmalara ihtiyaç vardır. İlk defa tarafımızdan gösterilmiş olan Nerium oleander tetikli bu olumlu etkilerin sadece elektrofizyolojik yönü ile değil aynı zamanda yapısal yönü ile de önemli olduğu kanaatindeyiz.

6.ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Oleander'in İzole Sıçan Kalp Kası Preparatı Üzerine Etkilerinin Elektrofizyolojik Yöntemlerle Araştırılması

"Nilüfer AKGÜN"

Biyofizik Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2014

Diyapatik kardiyomiyopati olarak bilinen ve çoğu zaman ölümle sonuçlanan patoloji, uzun süreli diyabete maruz kalan hastalarda gözlenen doğal bir sonuçtur. Uzun yıllardan beri streptozorocin (STZ) deneysel yolla hayvanlarda diyabet yapmak için kullanılmaktadır. Kimyasal yolla gerçekleştirilen bu deneysel diyabetin olmasını takip eden dört hafta içinde diyabete özel bir tür patoloji olan diyabetik kardiyomiyopati oluşmaktadır.

Gelişen miyopati sonrasında, kalbin hem elektriksel hem de mekaniksel özelliklerinde bazı değişimler olmaktadır. Kalp aksiyon potansiyeli süresinin uzaması ve kasılma gücündeki azalma ön plana çıkan en temel belirtilerdir.

Nerium oleander'in deneysel diyabetik sıçanlara verilmesi sonucunda kan şekeri değerinin kontrol değerlerine yaklaştığı gözlenmiştir. Bu çalışmada uygulanan NO diyabetin neden olduğu kasılma gücündeki bozulmayı düzelterek uzamış AP repolarizasyon evresinde de bir kısalmaya neden olmuştur. NO uygulaması sonrasında bu düzelme, NO' in aynen kardiyak glikozitler gibi Na^+/K^+ pompasının inhibisyonu aracılığı ile kalp kası hücrelerinde öncelikle depolarizasyonla başlayan bir pozitif inotropik etkiye neden olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışmada, hem tedavi hem de koruyucu amaçlı NO uygulamaları diyabete bağlı değişiklikler üzerine pozitif etkisinin umut verici olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Aksiyon potansiyeli; diyabet; zakkum.

7. SUMMARY

İnvestigation of the of Oleanderine on the Rat Heart Preparations with Electrophysiological Techniques

Diabetic cardiomyopathy is the natural secondary comlication of the long term explosure to diabets and usually ends up with the mortalities. For long being streptozotocine (STZ) is the well known chemical for the induction of experimental models of diabetes. This diabetes specific myopathy's symtoms can be seen within four weeks following the chemical administration in model studies.

There have been some changes in the mechanical the electrical activities of the heart following the myopathy. Among these changes increased action potentail duration and the decreased contratile forece are the major ones.

It has been shown that administration of Nerium oleander to diabetic rats restores the increased blood glucose levels. Current study for the first time have shown that the application of the NO to diabetic rats restores the diabetes induced cahnges both in the action potential and the contration parameters. Positive effect seen in here can be attributed to the inotrophic effect of NO through the Na^+/K^+ pump inhibition.

In summary, with this study it was shown that the both for the therapeutic and the prophylactic purposes administrations of NO have some promissing results on the diabetic cardiomyopathy.

Key Words: Action potential; diabetes mellitus; nerium oleander.

8. KAYNAKLAR

1. Ada SE, Al-Yahya MA, Al-Farhan AH. Acute toxicity of various oral doses of dried Nerium oleander leaves in sheep. Am J Chin Med., 2001;29(3-4): 525-32.

2. Adam SEI, Al-Yahya MA, Al-Farhan AH. Response of Najdi sheep to oral administration of Citrullus colocynthis, Nerium oleander leaves or their mixture. Small Ruminant Research, 2001;40: 239–44.

3. Afaq F, Saleem M, Aziz MH, Mukhtar H. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion markers in CD-1 mouse skin by oleandrin. Toxicol Appl Pharmacol., 2004,195(3): 361-9.

4. Akev N, Can A, Sütlüpınar N. Effect of Prunus mahaleb seeds on blood glucose level. IX. BİHAT, 16-19 Mayıs Eskişehir, Bildiriler. Ed: Başer KHC, 1991;641: 33-39.

5. Ayaz M, Deneysel diyabetik kardiyomiyopatide hücre içi serbest iyon derişimi. Ankara 2004, 9.

6. 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. 2004;426(1): 83-90.

7. Ayaz M, Selenyumun denesysel diyabetik sıçan kalbi ventrikül kasının elektriksel ve mekaniksel aktivitesi üzerine etkileri. Ankara, 1999, 8.

8. Ayaz M, Turan B. Selenium prevents diabetes-induced alterations in [Zn2+] and metallothionein level of rat heart via restoration of cell redox cycle.Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006;290(3): 1071-80.

9. Bas AL, Kaya S, Yazıhan N, Uney K. Patent No: WO/2010/082906, 2006, Use of Nerium Oleander for Diseases Manifested with Type Ii Diabetes, Obesity, High Cholesterol and Triglyceride.

10. Begum S, Siddiqui BS, Sultana R, Zia A, Suria A. Bio-active cardenolides from the leaves of Nerium oleander. Phytochemistry, 1996;50(3): 435-8.

11. Belke DD, Swanson EA, Dillmann WH. Decreased sarcoplasmic reticulum activity and contractility in diabetic db/db mouse heart. Diabetes, 2004;53: 3201–8.

12. Bellakhdar J, Claisse R, Fleurentin J, Younos C. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. J Ethnopharmacol, 1991;35(2): 123-43.

13. BERS DM. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature, 2002;415(68): 198-205.

14. Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Ziyyat A. Ethnopharmacology Forum Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. Int J Diabetes&Metabolism, 2002;10: 33-50.

15. Bonadonna RC, del Prato S, Bonora E, Gulli G, Solini A, DeFronzo RA. Effects of physiological hyperinsulinemia on the intracellular metabolic partition of plasma glucose. Am J Physiol 1993;265(6): 943-53.

16. Bonner-Weir S, Trent DF, Honey RN, Weir GC. Responses of neonatal rat islets to streprozotocin limited beta cell regeneration and hyperglycemia. Diabetes, 1981;30: 64-9.

17. Bozan B, Koşar M, Tunalıer Z, Değirmenci İ, Üstüner C, Başaran A, Başer KHC. Şeker hastalığında kullanıldığı bilinen bazı bitkilerin kan aminoasit düzeylerine etkisinin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile belirlenmesi. XI. BİHAT, 22-24 Mayıs Ankara, Bildiri kitabı. Ed: Coşkun M, Ankara Üniv Ecz Fak Yay No: 1997;75: 369-78.

18. Buren J. Glucose and lipid metabolism in insülin resistance-an experimental study in fat cells, Umea University Medical Dissertations, ISBN-, 91-7305-359-7, Umea University, Umea, Sweden, 2002.

19. Choi KM, Zhong Y, Hoit BD, Grupp IL, Hahn H, Dilly KW, Guatimosim S, Lederer WJ, Matlib MA. Defective intracellular Ca(2+) signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002;283(4): H1398-408.

20. Clay MA, Newnham HH, Barter PJ. Hepatic lipase promotes a loss of apolipoprotein A-I from triglyceride-enriched human high density lipoproteins during incubation in vitro. Arterioscler Thromb., 1991;11: 415– 22.

21. Çete S, Arslan F, Yaşar A. Investigation of antimicrobial effects against some microorganisms of aloe vera and Nerium oleander also examination of the effects on the xanthine oxidase activity in lever tissue treated with cyclosporine G.U. Journal of Science, 2005;18(3): 375-80.

22. Dunn JS, Sheenan M, Mcletchie NGB. Necrosis of islets of langerhans produced experimantally. Lancet, 1943;I: 484-7.

23. Ebasfi S, Endo M, Ohtsuki I. Control of muscle contraction. Q. Rew. Biophys., 1969;2: 351-84.

24. Eddouks M, Maghrani M, Lemhadri A, Ouahidi ML, Jouad H. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). J Ethnopharmacol, 2002;82(2-3): 97-103.

25. Arthur CG, Jhon EH. Editör; Cavusoglu H, Yegen BC. Tıbbi fizyoloji, 11. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2007, 100-110.

26. Erdemoglu N, Kupeli E, Yesilada E. Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. J Ethnopharmacol, 2003;89(1): 123-9.

27. Erol MK, Tuzlacı E. Eğirdir (Isparta) yöresinin geleneksel halk ilacı olarak kullanılan bitkileri. XI. BİHAT, 22-24 Mayıs Ankara, Bildiri kitabı. Ed: Coşkun M, Ankara Üniv Ecz Fak Yay No: 1977;75: 466-75.

28. Fein FS, Jırbstein LB, Strobeck JE, Capasso JM, Sonneblick EH. Altered myocardial mechanics in diabetic rats. Cir. Res., 1980;47(6): 922-33.

29. Fu L, Zhang S, Li N, Wang J, Zhao M, Sakai J, Hasegawa T, Mitsui T, Kataoka T, Oka S, Kiuchi M, Hirose K, Ando M. Three new triterpenes from Nerium oleander and biological activity of the isolated compounds. J. Nat. Prod., 2005;68(2): 198-206.

30. Gadsby DC. The Na^+/K^+ pumb of cardiac cells. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., 1984;13: 373-98.

31. Ganguly PK, Pierce GN, Dhalla KS, Dhalla NS. Defective sacroplasmic reticular calcium transport in diabetic cardiomyopathy. Am. J. Physiol., 1983;244(6): E528-35.

32. Ganong WF. Ganong'un tıbbi fizyolojisi, 16. Baskı, İstanbul, Barış Kitapevi, 1995, 27-32.

33. Garvey WT, Olefsky JM and Marshall S. Insulin induces progressive insulin resistance in cultured rat adipocytes. Sequential effects at receptor and multiple postreceptor sites. Diabetes, 1986;35(3): 258-67.

34. Goldberg IJ. Diyabetic dyslipidemia:Causes and consequenses, The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2001;86(3): 965-71.

35. Grover JK , Vats V , Rathi SS. Anti-hperglycemic effect of Eugenia jambolana and Tinospora cordifolia in experimental diabetes and their effects on key metabolic enzymes in volt in carbohydrate metabolism , Journal of Ethnopharmacology , 2000;73: 461-470 .

36. Haeba MH, Mohamed AI, Mehdi AW, Nair GA. Toxicity of Nerium oleander leaf extract in mice. J Environ Biol., 2002;23(3): 231-7.

37. Henry RR, Ciaraldi TP, Mudaliar S, Abrams L, Nikoulina SE. Acquired defects of glycogen synthase activity in cultured human skeletal muscle cells: influence of high glucose and insulin levels. Diabetes, 1996;45(4): 400-407.

38. Hibberd MG, Trentham DR. Relationships between chemical and mechanical event during muscular contraction. Annu. Rev. Biophys. Chem., 1986;48: 159-61.

39. Hill B. Membranes and ions, In: Excitable cells and neurophysiology, 21st Edition, New York, Sauders Company, 1989, 1-97.

40. Holland WC, Sekul A. Effect of ouabain on Ca45 and Cl36 exchange in isolated rabbit atria. Am J Physiol., 1959;197: 757-60.

41. Howarth FC, Qureshi MA, Hassan Z, Al Kury LT, Isaev D, Parekh K, Yammahi SR, Oz M, Adrian TE, Adeghate E. Changing pattern of gene expression is associated with ventricular myocyte dysfunction and altered mechanisms of Ca2+ signaling in young type 2 Zucker diabetic fatty rat heart. Exp Physiol., 2011;96: 325–37.

42. Huq MM, Jabbar A, Rashid MA, Hasan CM, Ito C, Furukawa H. Steroids from the roots of Nerium oleander. J Nat Prod., 1999;62 (7): 1065-7.

43. Huxley AF. Muscle structure and theories of contraction. Prog. Biophysics biophy. Chem., 1957;7: 255-318.

44. Idahl IA, Lernmark A, Schlin J, Taljedal IB. Studies on the function of pancreatic islet cell mebranes. J. Phsiol. (Paris), 1976;72: 729-46.

45. Iozzo P, Pratipanawatr T, Pijl H, Vogt C, Kumar V, Pipek R, Matsuda M, Mandarino LJ, Cusi KJ, DeFronzo RA. Physiological hyperinsulinemia impairs insulin-stimulated glycogen synthase activity and glycogen synthesis. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001;280(5): 712-9.

46. Jouad H, Haloui M, Rhiouani H, El Hilaly J, Eddouks M. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). J Ethnopharmacol, 2001;77(2-3): 175-82.

47. Katz AM, Tada NL. The “Stone heart”: a challenge to the biochemistry. Am. J. Cardiol, 1972;29: 578-80.

48. Katz AM, Weisfeldtr ML. Relaxation and diastolic properties of the heart, In: The heart and cardiovascular system, 2nd Edition, New York, Raven Pres, 1991, 803-818.

49. Katz AM. Contractile proteins of the heart. Physiol. Rev., 1970;50: 63-158.

50. Katz AM. Physiology of the heart, 2nd Edition, New York, Raven Pres, 1992, 1-73.

51. Kavalalı G, Tuncel H, Göksel S, Hatemi H. Urtica pilulifera (kara ısırgan) bitkisinin sıçanlar üzerindeki hipoglisemik etkisinin araştırılması. XII. BİHAT, 20-22 mayıs Ankara, Abstract Book, 1998, P-90.

52. Langford SD, Boor PJ. Oleander toxicity An examination of human and animal toxic exposures. Toxicology, 1996;109(1): 1-13.

53. Lee KS, Klaus W. Subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides. Pharmacol Rev., 1971;23: 193-261.

54. Lehrer SS. Effects of an interchain disufilde band on tropomysin structure: intrinsic fluorescence and circular dichroism studies, J. Mol. Biol, 1978;118: 209-26.

55. Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Weller B, Steiner G. Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. J Clin Invest., 1995;95:158 –166.

56. Lopaschuk GD, Tahiliani A, Vadlamudi RV, Katz S, Msneill JH. Cardiac sarcoplasmic reticulu function in insulin or carnitine-treated diabetic rats. Am. J. Physiol., 1983;245: 969-76.

57. Magyar J, Rusznak Z, Szentes P, Szucs G, Kovacs L. Action potentials and potassium currents in rat ventricular muscle during experimental diabetes.J Mol Cell Cardiol. 1992;24(8): 841-53.

58. Manjunath BL. The wealth of India, vol. VII (p. 15). New Delhi: Council of Scienti®c and Industrial Research, 1996.

59. Mariappan N, Elks CM, Sriramula S, Guggilam A, Liu Z, Borkhsenious O, Francis J. NF-kappaB-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes. Cardiovasc Res., 2010;85(3): 473-83.

60. Marles RJ, Farnsworth NR. Antidiabetic plants and their active constituents. Phytomedicine 1995;2(2): 137-189.

61. Mathews CK, van Holde KE. Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1990 Inc.

62. McDonald TF, Nawrath H, Trautwein W. Membrane currents and tension in cat ventricular muscle treated with cardiac glycosides. Circ Res., 1975;37(5): 674-82.

63. Mekhail T, Kaur H, Ganapathi R, Budd GT, Elson P, Bukowski RM. Phase 1 trial of Anvirzel in patients with refractory solid tumors. Invest New Drugs., 2006;24(5):423-7.

64. Mirsky I. Ventricular and atretial wall stresses based on large deformation analayses. Biophys. J., 1973;13(11): 1141-59.

65. Muller BM, Rosskopf F, Paper DH, Kraus J, Franz G. Polysaccharides from Nerium oleander: structure and biological activity, Pharmazie., 1991;46(9): 657-63.

66. Murray JM, Knox MK, Trueblood CE, Weber A. Porensiated state of the tropomyosin actin filament and nucleotide-containing myosin subfragment1. Biochemistry, 1982;21(5): 906-15.

67. Nadkarni KM. The Indian materia medica. vol. I (revised by A. K. Nadkarni) (pp. 847-849). Bombay: Popular Parkashan, 1976.

68. Nasir, E., & Ali, S. I. Flora of West Pakistan, vol. 148 (p. 19). Islamabad: Pakistan Agriculture Research Council, 1982.

69. Nayler WG. Effect of inotropic agents on canine trabecular muscle rendered highly permeable to calcium. Am J Physiol., 1973;225: 918-24.

70. Netticadan T, Temsah RM, Kenta A, Elimban V, Dhalla NS. Depressed levels of Ca2+-cycling proteins may underlie sarcoplasmic reticulum dysfunction in the diabetic heart. Diabetes. 2001;50(9): 2133-8.

71. Ni D, Madden TL, Johansen M, Felix E, Ho DH, Newman RA. Murine pharmacokinetics and metabolism of oleandrin, a cytotoxic component of Nerium oleander. J Exp Ther Oncol. 2002;2(5): 278-85.

72. Olefsky JM, Nolan JJ. Insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus: cellular and molecular mechanisms. Am J Clin.Nutr., 1995;61: 980S–6S.

73. Özbek H, Ceylan E, Kara M, Özgökçe F, Koyuncu M. Rheum ribes (uşkun) kökünün normal farelerde ve alloxan'la diyabet oluşturulmuş farelerde hipoglisemik etkisi. XIV. BİHAT, 29-31 Mayıs 2002 Eskişehir, Bildiri Özetleri. Anadolu Üniv Ecz Fak Farmakognozi AD ve TBAM, Eskişehir, B-13.

74. Özbek H. Foeniculum Vulgare Miller (Rezene) Meyvesi Uçucu Yağının Lethal Doz 50 (LD50) Düzeyi ve Sağlıklı ve Diyabetli Farelerde Hipoglisemik Etkisinin Araştırılması Van Tıp Dergisi, Cilt: 9, Sayı: 4, Ekim/2002.

75. Öztürk Y, Altan VM, Yıldızoglu-Arı N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. Pharmacological Reviews, 1996;48: 1-44.

76. Pereira L, Matthes J, Schuster I, Valdivia HH, Herzig S, Richard S, Go´mez AM. Mechanisms of [Ca2+]I transient decrease in cardiomyopathy of db/db type 2 diabetic mice Diabetes, 2006;55: 608–15.

77. Pogwizd SM, Schlotthauer K, Lee L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. Circ Res. 2001;88(11): 1159-67.

78. Purrello F, Rabuazzo AM. Metabolic factors that affect beta-cell function and survival. Diabetes Nutr Metab, 2000;13(2): 84-91.

79. Pushparaj P, Tan CH, Tan BKH. Effects of Averrhoa bilimbi leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin-diabetic rats. J Ethnopharmacol, 2000;72: 69-76.

80. Putkey JA, Sweeney HL, Cantbell ST. Site-directed mutation of the trigger calcium binding sites in cardiac troponin C. J. Biol. Chem., 1989;264: 12370-8.

81. Quinn L. Mechanisms in the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. The Epidemic of Type 2 Diabetes Mellitus, Journal of Cardiovascular Nursing., 2002;16(2): 1-16.

82. Ravens U, Wettwer E, Ohler A, Amos GJ, Mewes T. Electrophysiology of ion channels of the heart. Fundom Clin. Pharmacol. 1996;10: 321-28.

83. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease (syndromeX): an expanded definition. Annu Rev Med., 1993;44:121–31.

84. Rizza RA, Mandarino LJ, Genest J, Baker BA, Gerich JE. Production of insulin resistance by hyperinsulinaemia in man. Diabetologia 1985;28(2): 70-75.

85. Rossetti L, Giaccari A, DeFronzo RA. Glucose toxicity. Diabetes Care, 1990; 13(6): 610-630.

86. Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-α. Cytokine & Growth Factor Reviews., 2003;14: 447–55.

87. Ruch SR, Nishio M, Wasserstrom JA. Effect of cardiac glycosides on action potential characteristics and contractility in cat ventricular myocytes: role of calcium overload. J Pharmacol Exp. Ther., 2003;307(1): 419-28.

88. Sailaja YR, Baskar R, Saralakumari D. The antioxidant status during maturation of reticulocytes to erythrocytes in type 2 diyabetics. Free Radical Biology & Medicine, 2003;35(2): 133–9.

89. Shimmoni Y, Ewart HS, Severdson D. Insuline stimulation of rat ventricular K^+ currents depends on the integrity of the cytoskeleton. Journal of Physiology, 1999;514(3): 735-45.

90. Shimmoni Y, Ewart HS, Severdson D. Type I and II models of diabetes produce different modifications o K^+ currents in rat heart: role of insuline. Journal of physiology. 1998; 502(2): 485-96.

91. Shimmoni Y, Light PE, French RJ. Altered ATP sensitivity of ATP-dependent K^+ channels in diabetic rat hearts. Am. J. Physiol., 1998;275: E568-76.

92. Shimoni Y, Hunt D, Chuang M, Chen KY, Kargacin G, Severson DL. Modulation of potassium currents by angiotensin and oxidative stress in cardiac cells from the diabetic rat. J Physiol, 2005;567: 177–90.

93. Siddiqui BS, Begum S, Siddiqui S, Lichter W. Two cytotoxic pentacyclic triterpenoids from Nerium oleander. Phytochemistry, 1995;39(1): 171-4.

94. Siddiqui BS, Sultana R, Begum S, Zia A, Suria A. Cardenolides from the methanolic extract of Nerium oleander leaves possessing central nervous system depressant activity in mice. J Nat Prod., 1997;60(6): 540-4.

95. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, 1972;175: 720-731.

96. Smith JA, Madden T, Vijjeswarapu M, Newman RA. Inhibition of export of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) from the prostate cancer cell lines PC3 and DU145 by Anvirzel and its cardiac glycoside component, oleandrin. Biochemical Pharmacology, 2001;62: 469–472.

97. Sparks JD, Sparks CE. Insulin modulation of hepatic synthesis and secretion of apolipoprotein B by rat hepatocytes. J Biol Chem., 1990;265: 8854–62.

98.Sreenivasan Y, Sarkar A, Manna SK. Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor-kappa B and activator protein-1 and potentiates apoptosis induced by ceramide. Biochem Pharmacol, 2003;66(11): 2223-39.

99. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. Pharmacol Res, 2005;52(4): 313-20.

100. Stryer L. Biochemistry, 3rd Edition, New York, W. H. Freeman and Company, 1988, 283-312.

101. Taghibiglou C, Carpentier A, Van Iderstine SC, Chen B, Rudy D, Aiton A, Lewis GF, Adeli K. Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation,and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructosefed hamster model. J Biol Chem., 2000;275: 8416–25.

102.Tahraoui A, El-Hilaly J, Israili ZH, Lyoussi B. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). J.Ethnopharmacol. (article in press, corrected proof).2006;110(1): 105-17.

103. Unger RH, Grundy S. Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes. Diyabetologia 1985;28(3): 119-21.

104. Wahler, GM. Muscle and other contractile system section VI. Academic Pres. 1997.

105. Warne JP. Tumour necrosis factor α : a key regulator of adipose tissue mass Journal of Endocrinology, 2003;177: 351–5.

106. Watkins D, Cooperstein SJ, Lazarow A. Effects of alloxan on permeabilty of pancreatic islets tissue in vitro. Am. J. Physiol., 1964;207: 436-40.

107. Watson WA, Litovitz TL, Rodgers GC, Klein-Schwartz W, Youniss J. Rose, of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. American Journal of Emergency Medicine, 2002;21(5): 353-421.

108. Weaver DC, Mcdaniel ML, Nabber SP, Barry D, Lacy PE. Alloxan stimulation and inhibition from isolated rat islets of langerhands. Diabetes, 1978;27:1205-14.

109. Yesilada E, Biodiversity in Turkish Folk Medicine. In: Sener, B. (Ed.), Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization. Kluwer Academic/Plenum Publishers, London, pp. 2002;119–35.

110. Zhao M, Zhang S, Fu L, Li N, Bai J, Sakai J, Wang L, Tang W, Hasegawa T, Ogura H, Kataoka T, Oka S, Kiuch M, Hirose K, Ando M. Taraxasterane- and ursane-type triterpenes from Nerium oleander and their biological activities. J Nat Prod., 2006;69(8): 1164-7.

111. Zia A, Siddiqui BS, Begum S, Siddiqui S, Suria A. Studies on the constituents of the leaves of Nerium oleander on behavior pattern in mice. J Ethnopharmacol. 1997;49(1):33-9.

112. Zierath JR, Galuska D, Nolte LA, Thorne A, Kristensen JS, Wallberg-Henriksson H. Effects of glycaemia on glucose transport in isolated skeletal muscle from patients with NIDDM: in vitro reversal of muscular insulin resistance. Diyabetologia, 1994;37(3): 270-7.

10. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Samsun'da doğdu. İlköğretimini Atatürk İlköğretim Okulunda, lise eğitimini de Vezirköprü Anadolu Lisesinde tamamladı. 2007 yılında Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümüne girdi. 2011 yılında lisans eğitimini tamamladı.

2011 yılında Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildirileri;

1) Ayaz, M., Akgün, N., Baş, A.L., "Nerium Oleander'in Liyofilize Distilatının Tip 2 Deneysel Diyabetik Kardiyomiyopati Üzerine Etkileri", 24. Ulusal Biyofizik Kongresi, 16, İstanbul 2012.

2) Akgün,N., Ünal, Ö., "Mucize Bir Bitki: Tıhrıl" XVII. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 14-17 Temmuz 2010, Ankara

Bölüm çevirmenliği yaptığı kitaplar;

1) Sırları Çözülmüş Biyofizik. Biophysics Demystified Goldfarb, D., Çeviri Editörü: Ayaz , M., Nobel Kitapevleri Ltd. Şti., 1. Baskı İstanbul Sf. 55-74, 139-172 (ISBN: 978-975-6266-38-0), 2013. (Bölüm Çevirisi)

Aldığı ödüller;

1) 2008-2009 güz yarıyılı yüksek onur belgesi

2) 2008-2009 bahar yarıyılı yüksek onur belgesi