



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KARDİYOMİYOSİTLERDE HÜCRE İÇİ SODYUM
HOMEOSTAZINDA ROL OYNAYAN
FAKTÖRLERİN
İNCELENMESİ**

Ayça BİLGİNOĞLU

**BIYOFİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Belma TURAN**

2010- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARDİYOMİYOSİTLERDE HÜCRE İÇİ SODYUM
HOMEOSTAZINDA ROL OYNAYAN
FAKTÖRLERİN
İNCELENMESİ**

Ayça BİLGİNOĞLU

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Belma TURAN**

2010- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyofizik Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.
Tez Savunma Tarihi: 27/09/2010



Prof. Dr. Emine Koç
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Jüri Başkanı



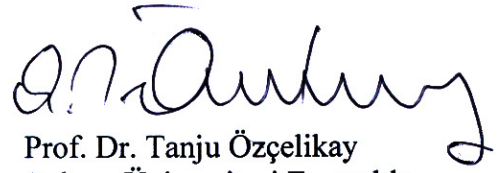
Prof. Dr. Belma Turan
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
(Danışman)



Prof. Dr. Feride Severcan
Orta Doğu Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Mehmet Uğur
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
(Tez izleme komitesi üyesi)



Prof. Dr. Tanju Özçelikay
Ankara Üniversitesi Eczacılık
Fakültesi
(Tez izleme komitesi üyesi)

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay Sayfası	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kalbin Genel Özellikleri	1
1.2. Kalp Kasındaki Elektriksel Olaylar	2
1.2.1. Aksiyon Potansiyeli ve İyon Akımları	2
1.2.2. Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi	4
1.3. Hücre İçi pH Düzenlenimi (Homeostazı)	6
1.3.1. Hücre İçi pH: Genel Bilgiler	6
1.3.2. Hücre İçi pH Düzenleminde Rol Alan Proteinler ve Diğer Yapılar	9
1.4. Hücre İçi Na ⁺ Düzenlenimi (Homeostazı)	12
1.4.1. Hücre İçi Na ⁺	12
1.4.2. Hücre İçi Na ⁺ ve Ca ²⁺ İlişkisi	19
1.4.3. Kalple İlgili Patolojilerde Hücre İçi Na ⁺ Düzenleminin Rolü	21
1.5. Diyabet Hastalığı	23
1.5.1. Genel Bilgiler	23
1.5.2. Deneysel Diyabet Modeli	25
1.5.3. Tip I Diyabet ve İnsülin İlişkisi	26
1.5.4. Diyabetik Kardiyomiyopatinin Genel Özellikleri	28
1.5.5. Diyabetik Kardiyomiyopatide Hücre İçi İyon Homeostazı: Na ⁺	31
1.6. Çalışmanın Amacı	33
2. GEREÇ VE YÖNTEM	35
2.1. Deney Gruplarının ve Diyabetin Oluşturulması	35
2.2. Aksiyon Potansiyelinin Kaydedilmesi	36

2.3. Kardiyomiyositlerin Elde Edilmesi	38
2.4. Voltaj-Kapılı Na ⁺ Kanal Akımı Ölçümü	38
2.5. Hücre İçi Na ⁺ ([Na ⁺] _i) Floresan Şiddetinin Ölçümü	39
2.5.1. Bazal [Na ⁺] _i Floresan Şiddetinin Ölçümü	39
2.5.2. Farklı Uyarı Frekanslarına Karşılık [Na ⁺] _i Floresan Şiddetinin Ölçümü	40
2.6. Hücre İçi pH ([H ⁺] _i) ve Sitoplazmik Asit Konsantrasyonunun Ölçümü	40
2.6.1. ([H ⁺] _i)' nun Konfokal Mikroskop İle Ölçülmesi	41
2.6.2. NHE Üzerinden Gerçekleşen Serbest Sitoplazmik Asit Konsantrasyon Değişikliklerinin Saptanması	41
2.7. Biyokimyasal Analizler	42
2.7.1. Hücre Zarının Hazırlanması	42
2.7.2. NCX Protein Seviyesinin Ölçümü	42
2.7.3. NKA Protein Seviyesinin Ölçümü	43
2.7.4. NHE Protein Seviyesinin Ölçümü	44
2.8. İstatistiksel Analizler	45
2.9. Kullanılan Kimyasallar	46
3. BULGULAR	47
3.1. Hayvanların Genel Özellikleri	47
3.2. Diyabetin Aksiyon Potansiyeli Parametrelerine Etkisi	48
3.3. Deneysel Diyabetin ve İnsülin Tedavisinin Voltaj-kapılı Na ⁺ Kanalları Üzerine Etkisi	51
3.3.1. Voltaj-Kapılı Na ⁺ Kanal Akımı İle İlgili Parametreler	52
3.3.2. Voltaj-Kapılı Na ⁺ Kanallarının Aktivasyonu ve İnaktivasyonu İle İlgili Parametreler	54
3.4. Deneysel Diyabetin ve İnsülin Tedavisinin [Na ⁺] _i Floresan Şiddeti Üzerine Etkisi	56
3.4.1. Bazal [Na ⁺] _i Floresan Şiddeti İle İlgili Parametreler	56
3.4.2. Farklı Uyarı Frekanslarına Bağlı [Na ⁺] _i Floresan Şiddetinin Değişim Deseni	61
3.5. Deneysel Diyabetin ve İnsülin Tedavisinin Sodyum-Hidrojen Değiş-Tokuşçusu Aracılı Olarak Hücre İçi pH Üzerine Etkisi	69
3.6. Deneysel Diyabetin ve İnsülin Tedavisinin Hücre Zarı Üzerinde Na ⁺ Taşıyan Proteinlerin Seviyeleri Üzerine Etkisi	72

3.6.1. Sodyum-Kalsiyum Değiş-Tokuşçusu Protein Seviyesi İle İlgili Parametreler	72
3.6.2. Sodyum-Hidrojen Değiş-Tokuşçusu Protein Seviyesi İle İlgili Parametreler	73
3.6.3. Sodyum-Potasyum Pompası Protein Seviyesi İle İlgili Parametreler	74
4. TARTIŞMA	76
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
ÖZET	85
SUMMARY	86
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	111

ÖNSÖZ

Literatür bilgileri ışığında, hücre içi Na^+ değişiminin (homeostazı), kalp uyarılma-kasılma çiftleniminde önemli göreve sahip olan Ca^{2+} homeostazının düzenlenmesinde ve aksiyon potansiyeli oluşumu sırasındaki hücre zarı potansiyelinin değişiminde çok önemli role sahip olduğu gösterilmiştir. Bu amaçla yola çıkarak, bu çalışmada, hücre içi Na^+ düzenlenimini ve hücre içi Na^+ un tip-1 diyabette nasıl değiştiğini araştırmaya çalıştık.

Bu tez çalışmamda her türlü desteğini esirgemeyen ve tezimin danışmanlığını yapan sayın Prof. Dr. Belma Turan'a teşekkür ederim.

Tez süresince yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Mehmet Uğur' a, hücre içi pH ölçümlerindeki yardımları için Yrd. Doç. Dr. H. Burak Kandilci' ye, voltaj bağımlı Na^+ kanal akımı ölçümleri için Ali Aytaç Seymen' e ve serum insülin seviyelerinin ölçümü için, Esmâ Nur Zeydanlı' ya ve diğer tüm yardımları için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Teknolojileri AR-GE Birimine teşekkür ederim.

Maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan ve bana güç veren sevgili Aileme ve özellikle de biricik ANNECİĞİME teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AP	Aksiyon potansiyeli
CICR	Ca ²⁺ uyarımlı Ca ²⁺ salımı
[Ca ²⁺] _i	Hücre içi serbest Ca ²⁺ derişimi
NCX	Na ⁺ /Ca ⁺ değiştokuşçusu
InsP ₃	İnozitol-tri-fosfat
PLM	Fosfolamban
RyR	Riyanodin reseptörü
SERCA	Sarco/endoplazmik retikulum Ca ²⁺ ATPaz
IDDM	İnsüline bağlı diabetes mellitus
NIDDM	İnsüline bağlı olmayan diabetes mellitus
HLA	İnsan lökosit antijeni
STZ	Streptozotosin
β-AR	β-Adrenerjik reseptör
PKA	Protein kinaz A
PKC	Protein kinaz C
DM	Diabetes mellitus
I _{Na}	Voltaj-kapılı Na ⁺ kanal akımı
I _{to}	Dışarı doğru geçici K ⁺ kanal akımı
I _K	Gecikmiş doğrultucu K ⁺ kanal akımı
I _{Ca}	L-tipi Ca ²⁺ kanal akımı
SR	Sarkoplazmik retikulum
pH _i	Hücre içi pH
LCC	L-tipi Ca ²⁺ kanalı
NKA	Na ⁺ /K ⁺ pompası
TnC	Troponin C
NBC	Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ ortak taşıyıcısı
NHE	Na ⁺ /H ⁺ değiş-tokuşçusu
MCT	Laktat/H ⁺ ortak taşıyıcısı
β _i	Hücre içi tamponlama kapasitesi
CBE	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ değiş-tokuşçusu

CHE	Cl ⁻ /OH ⁻ değiş-tokuşçusu
[H ⁺] _i	Hücre içi H ⁺ konsantrasyonu
T-tübül	Transfer tübül
PIP2	Fosfotidilinozitol-4,5-bisfosfat
I _{pump}	Na ⁺ /K ⁺ pompa akımı
rIGF-1	Sıçan insülin büyüme faktörü-1
PMCA	Sarkolemmal Ca ²⁺ pompası
HR	Kalp hızı
EDD	Endotel-bağımlı dilatasyon
EID	Endotel-bağımsız dilatasyon
[Na ⁺] _i	Hücre içi Na ⁺ konsantrasyonu
TP	Tepe değerine ulaşma süresi
APD	Aksiyon potansiyeli süresi

ŞEKİLLER

- Şekil 1.1. Ventrikül aksiyon potansiyelinin evreleri ve ona karşılık gelen iyon akımları. 2
- Şekil 1.2. Ventrikül hücrelerinde hücre içi Ca^{2+} düzenlenmesi. 5
- Şekil 1.3. Ventrikül hücre zarında hücre içi H^+ düzenlenmesinde görevli taşıyıcı proteinlerin şematik olarak gösterimi. 10
- Şekil 1.4. Ventrikül hücre zarında hücre içi pH' ya bağlı olarak hücreden asit çıkışının ve asit girişinin gösterimi. 11
- Şekil 1.5. Hücre zarında bulunan Na^+ taşınım mekanizmalarının gösterimi. 13
- Şekil 1.6. Kalp hücre zarında bulunan NKA' nın yapısal olarak gösterimi. 16
- Şekil 1.7. Kalp hücre zarında bulunan NKA çalışma prensibinin gösterimi. 16
- Şekil 1.8. Hücre zarında bulunan voltaj-kapılı Na^+ kanalının yapısının gösterimi. 18
- Şekil 1.9. İnsülinin metabolizmadaki etkisi. 26
- Şekil 1.10. İnsülin reseptörünün yapısı. 27
- Şekil 1.11. Dinlenim ve kasılma durumunda $[Na^+]_i$ düzenlenmesi. 34
- Şekil 2.1. Sol ventrikül papiller kastan kayıt edilen örnek aksiyon potansiyeli üzerinde ölçülen parametrelerin gösterilmesi. 37
- Şekil 3.1: Kalbin sol ventrikülünde bulunan papiller kasından kayıt edilen örnek aksiyon potansiyeli eğrileri. 49
- Şekil 3.2: Deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde ölçülen Na^+ kanal akımı ile ilgili parametreler. 53

Şekil 3.3: Deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde ölçülen voltaj-kapılı Na^+ kanallarının akım, aktivasyon ve inaktivasyon ile ilgili parametreleri. 55

Şekil 3.4: Tüm deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde SBFI ile yüklenme durumunun gösterimi. 58

Şekil 3.5: Kardiyomiyositlerde ölçülen bazal $[\text{Na}^+]_i$ floresan şiddetinin ortalama değerlerinin gruplara göre dağılımı. 59

Şekil 3.6: Tüm deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde bazal $[\text{Na}^+]_i$ floresan şiddeti gösterimi. 60

Şekil 3.7: Deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde Na^+ -Green ile yüklenme durumunun gösterimi. 62

Şekil 3.8: Uyarıya karşı oluşan $[\text{Na}^+]_i$ floresan şiddetinin deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde örnek gösterimi. 64

Şekil 3.9: Farklı uyarı frekanslarına (0,2 Hz, 0,8 Hz, 1,0 Hz, 1,5 Hz ve 2,0 Hz) karşılık oluşan $[\text{Na}^+]_i$ floresan şiddeti yanıtlarının gösterimi. 65

Şekil 3.10: Farklı uyarı frekanslarına (0,2 Hz, 0,8 Hz, 1,0 Hz, 1,5 Hz ve 2,0 Hz) karşılık oluşan $[\text{Na}^+]_i$ floresan şiddeti yanıtlarının gösterimi. 66

Şekil 3.11: Farklı uyarı frekanslarına (0,2 Hz, 0,8 Hz, 1,0 Hz, 1,5 Hz ve 2,0 Hz) karşılık oluşan $[\text{Na}^+]_i$ floresan şiddeti yanıtlarının deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerdeki ortalama değerlerinin gösterimi. 68

Şekil 3.12: Farklı uyarı frekanslarına (0,2 Hz, 0,8 Hz, 1,0 Hz, 1,5 Hz ve 2,0 Hz) karşılık oluşan $[\text{Na}^+]_i$ floresan şiddeti yanıtlarının tüm deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerdeki ortalama değerlerinin gösterimi. 69

Şekil 3.13: Kontrol ve diyabetli kardiyomiyositlerde farklı pH_i değerine karşılık gelen $d[\text{H}]/dt$ miktarlarının (A) ve bazal pH (B) gösterimi. 70

Şekil 3.14: Deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde NCX protein seviyesinin gösterimi. 73

Şekil 3.15: Deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde NHE protein seviyesinin gösterimi. 74

Şekil 3.16: Deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde NKA protein seviyesinin gösterimi. 75

Şekil 4.1. Diyabet durumunda $[Na^+]_i$ düzenlenmesi. 82

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1: Hayvanların vücut ağırlığı, kan şekeri ve serum insülin değerleri.	48
Çizelge 3.2: Aksiyon potansiyeli ile ilgili parametreler.	50
Çizelge 3.3: Aksiyon potansiyeli repolarizasyon fazı parametreleri.	51
Çizelge 3.4: Na⁺ kanal akımı aktivasyon ve inaktivasyon parametreleri.	56
Çizelge 3.5: Kontrol ve diyabet grubuna ait bazal pH değerlerinin d[H⁺]/dt parametreleri.	71

1. GİRİŞ

1.1. Kalbin Genel Özellikleri

Kas yapısında olan kalp, doku ve organların gerek duyduğu oksijeni ve besinleri kan yoluyla pompalayan bir organdır. Dış yüzeyi fibröz bir kılıf olan epikardiyum ile iç yüzeyi bir bağ dokusu olan endokardiyum ile çevrilidir. Epikardiyum ve endokardiyum arasında ise kalbin kas tabakasını oluşturan miyokardiyum bulunur. (Katz, 1992)

Miyokardiyumu oluşturan kalp kası hücrelerinin (kardiyomiyosit) zarına sarkolemma adı verilir. Kardiyomiyositler birbirlerine interkale disk denilen hücre zarı ile bağlıdırlar. İnterkale disklerin bulunduğu bölgelerde; gedik-kavşak (gap junction) denilen hücreler arası uyarı iletimini sağlayan bağlantılar bulunur. Bu kavşaklar elektriksel iletimi sağlarken desmosomlar da hücreler arası mekanik bağlantıyı oluştururlar. Bu şekilde kalbin fonksiyonel bir sinsityum gibi davranması gerçekleşir. (Katz,1992)

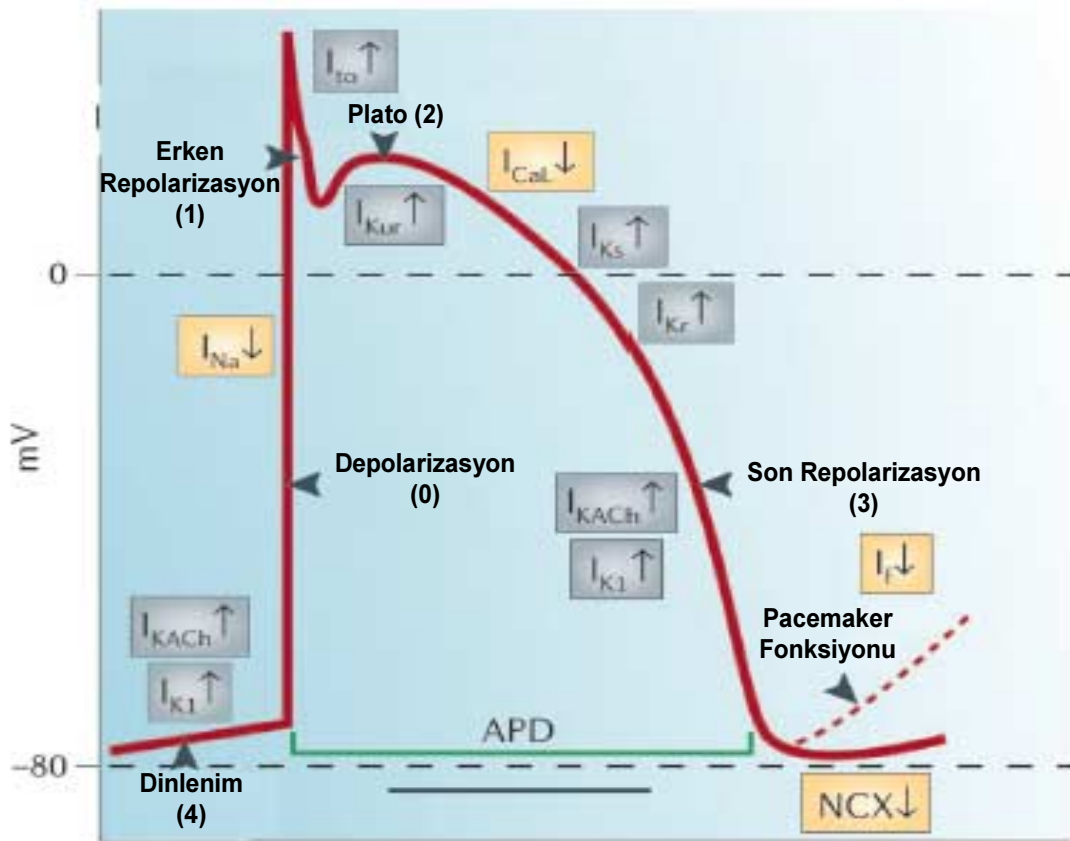
Kalbi uyaracak sinyallerin başlaması ve yayılması için kalbin doğrudan bağlantılı olduğu bir sinir sistemine ihtiyaç yoktur. Kalpte uyarı tek bir noktadan, sinoatriyal düğümünden başlar. Sinoatriyal düğüm kalbin sağ atriyuma bakan kısmında, epikardiyumun hemen altında bulunup, kalbin ritmini kontrol eder. Sinoatriyal nodu atriyoventriküler noda birleştiren atriyoventriküler internodal yollar bulunur. Uyarı buradan da sağ ve sol ventrikül endokard tabakasında bulunan his demetlerine ulaşır. Buradan da subendokardiyal kas lifi ağı olan ve çok büyük lifler olan purkinje liflerine iletilir. Bu dallar her iki ventrikülü çevrelemek üzere aşağı ventrikül apeksine ve oradan da arkaya kalbin tabanına doğru giderek daha küçük dallara ayrılarak ilerler. Bu şekilde elektriksel iletinin kalbin her bölümüne iletilmesi gerçekleşir (Guyton, 2006).

1.2. Kalp Kasındaki Elektriksel Olaylar

1.2.1. Aksiyon Potansiyeli ve İyon Akımları

Kalp kası hücrelerinin kasılması sarkolemmadan iyonların geçişi ile başlar ve sürdürülür. Hücre zarındaki birçok iyon kanalı ve iyon geçişini sağlayan sistem, aksiyon potansiyelinin oluşumunda görevlidir (Grant, 2009).

Oluşan aksiyon potansiyelinin (AP) hücreler arası iletimini interkale diskler sağlarken tüm kalp üzerinde uyarının iletimini ise özellikle His demeti, Purkinje lifleri ve onların dallanmaları sağlamaktadır. Bu şekilde kalpteki bütün uyarılar kas hücrelerine iletilebilmekte ve kalbin kasılması gerçekleşmektedir.



Şekil 1.1. Ventrikül aksiyon potansiyelinin evreleri ve ona karşılık gelen iyon akımları (Nattel & Carlsson, 2006).

Kalp hücreleri arasında farklılık gösteren AP, ventrikül hücrelerinde Şekil 1.1.'de gösterildiği gibi 5 evreden oluşur. Faz 0, depolarizasyon; faz 1, erken repolarizasyon; faz 2, plato; faz 3, son repolarizasyon; faz 4 ise dinlenme membran potansiyeli evresi olarak da tanımlanmaktadır. Bu evrelerin oluşmasında etkili olan iyon akımları da aynı fazların yanında gösterilmektedir.

Faz 0, hızlı depolarizasyon evresi olarak da bilinen bu evrede, voltaj bağımlı Na^+ kanallarının aktif hale gelmesi ile hücre içine doğru sodyum akımı (I_{Na}) oluşur. Bu akımın hızlı aktivasyon ve inaktivasyon kinetikleri vardır. 1 ms'de tepe değerine ulaştıktan sonra kendiliğinden azalır (inaktivasyon). Ufak bir depolarizasyonla Na^+ kanalları açılmaya başladığında, elektrokimyasal gradiyentten dolayı Na^+ hücre içine girmeye başlar. Bu durum hücrenin daha fazla depolarize olmasına ve depolarize oldukça da yeni Na^+ kanallarının açılmasına neden olur. Ayrıca zar potansiyelindeki bu değişim diğer iyon kanallarının aktive olmasını sağlayarak, AP' nin devamının belirlenmesinde de önemli bir rol oynar.

Faz 1, zar potansiyelinde hızlı bir repolarizasyonun meydana geldiği, AP' nin kısa süren bir evresidir. Depolarizasyon sırasında dışarıya doğru geçici K^+ akımını (I_{to}) oluşturan K^+ kanallarının aktive olmasıyla hücre dışına doğru K^+ geçişi sağlanır. Repolarizasyon fazında önemli olan diğer bir akımda Cl^- akımıdır. Cl^- kanallarının aktif hale gelmeleri ile hücre içine doğru Cl^- iyonu geçişi olur.

Faz 2, kalp kası hücrelerinde AP' nin uzun olduğu ve zar potansiyelinin göreceli sabit kaldığı plato evresidir. Bu evrede, hücre içine doğru L-tipi Ca^{2+} kanallarından I_{Ca} oluşurken, hücre dışına doğru da K^+ kanalı boyunca oluşan gecikmiş doğrultucu akım (I_{K}) meydana gelir. L-tipi Ca^{2+} kanallarından hücre içine doğru Ca^{2+} girişi kas kasılmasının başlamasına neden olur.

Faz 3, AP' nin son repolarizasyon evresidir. İnaktivasyonu olmadığından dolayı, I_{K} , plato evresinin sonunda ulaşabileceği en yüksek değere ulaşır. Bu evrede hücre zarı hızlıca dinlenme zar potansiyeline dönmeye başlar.

Faz 4, hücre zarının dinlenme zar potansiyelinde bulunduğu evredir. Elektronegatif potansiyeldeki hücre zarı, K^+ için geçirgendir. Dinlenme zar potansiyelini belirleyen K^+ un içeri doğrultucu akımı (I_{K1}) bu evrede meydana gelir. Dinlenme zar potansiyelinin belirlenmesinde önemli olan diğer iyonik yollardan biri olan Na^+-Ca^{2+} değiş-tokuşucu (NCX), her Ca^{2+} iyonuna karşılık 3 Na^+ iyonunu hücre içine taşıyarak hücre içinde pozitif yük iyon hareketine sebep olur. Na^+/K^+ pompası da (NKA) 3 Na^+ iyonunun hücre dışına, 2 K^+ iyonunun da hücre içine hareketini sağlayarak kas hücresindeki iyon dengesinin devamlılığını korumaktadır (Grant, 2009).

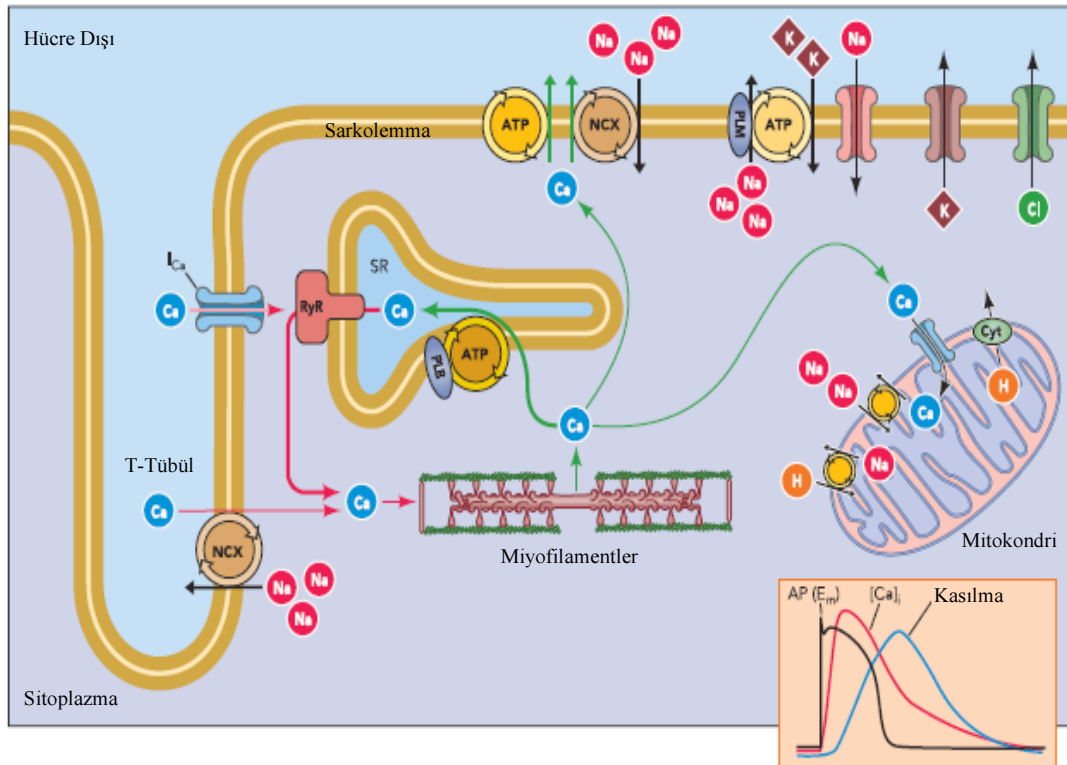
1.2.2. Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi

Kalbin kasılması için gerekli olan sinyal, hücre zarını depolarize duruma getiren AP ile başlar. Hücre zarının depolarizasyonunda hücre içine doğru oluşan Na^+ akımı, yine hücre içine doğru olan ikinci bir akımın oluşmasına neden olur (Katz, 1992). Bu akım, depolarizasyonla aktive olan Ca^{2+} kanalında yani L-tipi Ca^{2+} kanalında oluşan Ca^{2+} akımıdır (I_{Ca}) (Bers, 2002). I_{Ca} , Na^+ taşıyan akıma göre daha yavaştır ve Ca^{2+} hücre içine doğru bir elektrokimyasal gradiyent doğrultusunda taşır (Şekil 1.2.).

Sarkoplazmik retikulumdan (SR) Ca^{2+} salınımı, uyarılma-kasılma çiftlenimi yolağının önemli bir aşamasını oluşturur. SR' dan sitoplazmaya Ca^{2+} salınımı çeşitli mekanizmalar ile meydana gelir (Bers, 2006). Bu mekanizmalardan en yaygın olarak kabul edileni L-tipi Ca^{2+} kanallarından hücre içine giren Ca^{2+} ile “ Ca^{2+} uyarımlı Ca^{2+} salınımı” (CICR) yolunun başlamasıdır (Bracken ve ark., 2003; Bers, 2002). Bu mekanizmada; L-tipi Ca^{2+} kanallarından hücre içine giren Ca^{2+} , SR yüzeyindeki ryanodin reseptörleri aracılığı ile sitoplazmaya büyük oranda Ca^{2+} salınımının gerçekleşmesine neden olur. Böylece kalbin diastolik durumda iken sahip olduğu hücre içi serbest Ca^{2+} konsantrasyonu ($[Ca^{2+}]_i$) 100 nM' dan sistolik durumundaki $[Ca^{2+}]_i$ olan 1 μ M' a yükselir.

T-tipi Ca^{2+} kanallarından hücre içine Ca^{2+} girişi ile CICR' nın başlaması (Vassort ve ark., 2006), NCX ile hücre içine Ca^{2+} girişi ile CICR oluşumu (Liu ve ark., 2010), SR yüzeyindeki inozitol (1,4,5)-üç-fosfat ($InsP_3$) reseptörlerine $InsP_3$ ' ın bağlanması ile Ca^{2+} salınımı (Lipp, 2000) SR' dan Ca^{2+} salımının oluşmasını sağlayan diğer mekanizmalardır.

Kasılma olayı kabaca %85' i SR' dan salınan, %15' i hücre dışından giren, hücre içindeki Ca^{2+} un, bir kas proteini olan troponin-C molekülüne bağlanması ile başlar (Rayment ve ark., 1993). Oluşan troponin C- Ca^{2+} kompleksi yine bir kas proteini olan tropomiyozin molekülü ile etkileşerek onun aktin filamentleri üzerinden kaymasını sağlar. Böylece miyozin başının aktin filamentine bağlanmasında aradaki bir engel ortadan kalkmış olur. Aktin ve miyozindeki aktif bölgelerin etkileşimi çapraz köprünün oluşmasını sağlar. Sonuçta kasın boyunun da kısılması ile kas kasılması gerçekleşir (Bers, 2006).



Şekil 1.2. Ventrikül hücrelerinde hücre içi Ca^{2+} düzenlenmesi. Şeklin altındaki eğriler aksiyon potansiyelini, hücre içi geçici Ca^{2+} değişimini ve kasılmanın zamana bağlı olarak değişimlerini göstermektedir. SR, sarkoplazmik retikulum; NCX, Na^+/Ca^{2+} değiştokuşucu; PLB, fosfolamban; RyR, Riyanodin reseptörü (Bers, 2006).

Hücre içine elektrokimyasal gradiyent doğrultusunda giren Ca^{2+} , un, sarko-endoplazmik Ca^{2+} ATPaz (SERCA) tarafından SR içine, mitokondri zarında bulunan Ca^{2+} pompası tarafından mitokondri içine alınması ve hücre zarında bulunan NCX tarafından hücre dışına atılması ile kalbin diyastol durumuna geçmesi gerçekleşir. (Endoh, 2008).

1.3. Hücre İçi pH Düzenlenimi (Homeostazi)

1.3.1. Hücre İçi pH: Genel Bilgiler

Hücre içi pH (pH_i) kalbin uyarılma-kasılma çiftleniminde rol oynayan önemli bir düzenleyicidir (Harrison ve ark., 1992). Çünkü pH_i metabolik yollardan etkilenmekte ve fizyolojik olarak kontrol edilmektedir. pH_i düzenleniminin klasik modeli sarkolemmadaki asit/baz taşınım proteinlerinden oluşmaktadır. pH_i ' nin uzaysal olarak düzenlenimi, hücreler arasındaki gedik-kavşaklar aracılığı ile H^+ nun pasif olarak taşınması ile gerçekleşir. Bu pasif geçişler, ortamdaki proton (H^+) sayısının arttığı durumlarda da gerçekleşmektedir. Dolayısıyla pH_i , hücre içinde ve hücreler arasında protonların hareketini sağlayan taşıyıcı moleküllere bağlıdır (Vaughan-Jones ve ark., 2006).

Hücre fonksiyonu, hücre metabolizma tarafından kontrol edilir ve bu metabolizma H^+ nun artımı olarak tanımlanan hücre içi asitliğe neden olur (Stryer, 2002). Örneğin, aerobik metabolizmada H^+ nun salınmasına neden olan CO_2 üretilirken, anaerobik metabolizmada laktik asit şeklinde H^+ üretilir (Stryer, 2002). Özellikle hücre proteinlerle beraber iken, H^+ oldukça reaktiftirler. Bu yüzden de H^+ nun, üretildikten sonra sitoplazmadan uzaklaştırılması gerekmektedir (Fabiato ve ark., 1978).

Asidik ya da alkali durum logaritmik pH' değerinden belirlenir. pH ise, H^+ nun negatif logaritması alınarak belirlenir. Kalpte kararlı durumdaki pH_i yaklaşık olarak 7,2 değerindedir (Bountra ve ark., 1989).

Hücre içi asit/baz dengesinin normal olmadığı durumlarda, kasılma, elektriksel aktivite ve Ca^{2+} sinyal yolağı üzerinden kalp çıktısı etkilenmektedir (Fabiato ve ark., 1978; Orchard ve ark., 1990; Choi ve ark., 2000). Asidozun en önemli etkisi Ca^{2+} un troponin C' ye (TnC) bağlanmasının zayıflaması ile kasılma gücünün azalmasıdır (Orchard ve ark., 1990). Ayrıca, asit çıkışı sağlayan taşıyıcı proteinlerin de inaktif olması durumunda Ca^{2+} transientlerinin genliklerinde bir azalma meydana geldiği de gösterilmiştir. Uygun koşullarda, hücre sel asidoz değerine bağlı olarak farklı derecelerde Ca^{2+} sinyal yolağında görevli bir çok protein örneğin, sarkolemmal Na^+/Ca^{2+} değiş-tokuşçusu (NCX) (Philipson ve ark., 1982), L-tipi Ca^{2+} kanalı (LCC) (Komukai ve ark., 2001), sarkoplazmik retikulumdan (SR) Ca^{2+} salınımında görevli ryanodin reseptörleri (RyR2) (Balnave ve ark., 2000) ve SR Ca^{2+} ATPaz (SERCA) (Mandel ve ark., 1982) inhibe olurlar.

Hücre içi asit yüklenmesinin elimine edilmesi ile, asidoza karşı oluşan pH_i ' nin düzenleyici yanıtı olarak, Ca^{2+} sinyal yolağındaki ve kasılmadaki inhibisyonun uzaklaştırılması gerçekleşir. pH_i ' nin hala asidik olduğu durumda kısmi olarak kompanse edilmesi yoluyla hızlı bir şekilde Ca^{2+} transientlerinin genliğinin arttığı incelenmiştir (Harrison ve ark., 1992). Bu durum ise, TnC' ye Ca^{2+} bağlanmasının eski hale dönmesine ve böylelikle de kasılmanın sürdürülmesine neden olmaktadır. Asidoz sırasında, Na^+/H^+ değiş-tokuşçusu (NHE), ve Na^+/HCO_3^- ortak taşıyıcısının (NBC) aktif hale geçmesi ile Na^+ un hücre içine taşınması gerçekleşir (Boutra ve ark., 1989; Harrison ve ark., 1992; Yamamoto ve ark., 2005). Bu şekilde hücre içinde Na^+ artışı meydana gelir. Artan Na^+ ise, NCX tarafından hücre içine Ca^{2+} girişini tetikler. Hücre içinde biriken Ca^{2+} ise, SERCA tarafından SR içine taşınır. SR' ın fazla yüklenmesi sonucunda, Ca^{2+} RyR2 aracılığı ile sitoplazmaya salınır. Böylelikle hücre içinde Ca^{2+} artışı meydana gelir (Harrison ve ark., 1992; Choi ve ark., 2000). Böylece, hücre içinden hücre dışına doğru asit çıkışı sağlayan proteinler, hücre içi asidoza karşı Ca^{2+} sinyal yolağının temel elemanları arasında bulunmaktadır (Harrison ve ark., 1992).

Kardiyomiyositlerde pH_i ' nin hızlı bir şekilde düzenlenimi, kalp hastalıklarında örneğin iskemi/reperfüzyonda önemlidir (Steenbergen ve ark., 1977). İskemi

sırasında, pH_i ' deki düşüş, anaerobik metabolizmanın regülasyonunun bir sonucudur (Cascio ve ark., 1992). Ayrıca bu durum damar yollarındaki asidin uzaklaştırılmasındaki eksiklik ile de ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle hücre içi laktat seviyesi de yükselir. Buna bir paradoks yaklaşım olarak da, hücre içi HCO_3^- tarafından H^+ ' nın tamponlanması sonucu olarak lokal PCO_2 ' de bir artış oluşur (Cascio ve ark., 1992). Bütün bu olaylar dizi ise, sarkolemmal asit çıkışının etkinliğini azalmasına ve lokal olarak hücre dışı pH ' nin düşmesine neden olur.

Reperfüzyon ve re-oksjenlenme sırasında, hücre dışı asidoz tarafından (laktat/ H^+ ortak taşıyıcısı, MCT aracılığı ile) sarkolemmal asit çıkışı gerçekleşir. Laktat ve H^+ ' nin ortak taşınımı ile, MCT pH_i ' nin normale dönmesinde görevli olduğu incelenmiştir (Vandenberg ve ark., 1993; Halestrap ve ark., 1997).

Kalpde hipertrofi durumunda, NHE1 seçici inhibitörlerinin düşük miktarlarda kullanıldığı durumda, hipertrofinin azaldığı ya da normale döndüğü gösterilmiştir (Cingolani ve ark., 2007; Baartscheer ve ark., 2008). Bu durumun altında yatan mekanizma tam olarak açık değildir ancak bu durum NHE ve NBC aktivasyonu ile hücre içi Na^+ artışına, hücre içi Na^+ artışı ile NCX aracılığıyla hücre içine Ca^{2+} girişine ve hücre içi artmış Ca^{2+} 'nun SERCA tarafından SR içine alınmasına, böylece SR' un Ca^{2+} 'nu ile fazla yüklenmesine ve sonuçta Ca^{2+} 'nun RyR2 tarafından sitoplazmaya salınması ile açıklanmıştır (Berridge ve ark., 2006).

Kardiyomiyosit pH_i ' deki değişiklikler hücre içi tamponlama kapasitesi (β_i) ile ters ilişkilidir. β_i kardiyomiyositlerde hücre içi asit/baz dengesizliğine karşı aşırı asit yüklenmesini ya da aşırı baz yüklenmesini düşürerek bir savunma oluşturur (Boron, 1989). Bununla birlikte, tamponlama mekanizması, pH_i ' deki bir değişikliği önleyemez ama sadece onun genliğini değiştirebilir. pH_i daha çok sarkolemmada bulunan asit/baz dengesini sağlayan taşıyıcı proteinler tarafından kontrol edilir (Vaughan-Jones, 1988; Madhus, 1988).

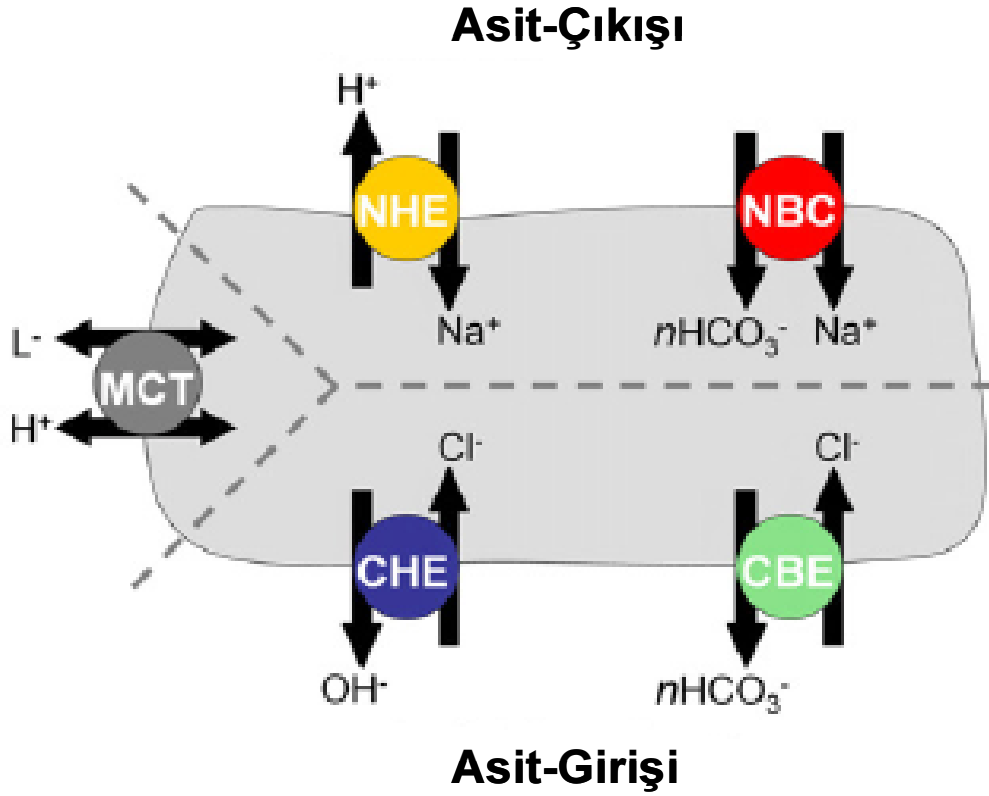
STZ uygulamalı 8-10 haftalık diyabetli sıçanlardan izole edilen kardiyomiyositlerde karboksi-SNARF-1 boyası kullanarak pH_i ' nin kontrol grubu

kardiyomiyositlerine göre nasıl değiştiği incelenmiştir (Le Prigent ve ark., 1997). Kalp ventrikülündeki papiller kas hücrelerinde yapılan deneylerle (Lagadic-Gossmann ve ark., 1988) benzer olarak, pH_i 'nin asidifikasyondan kurtulmasının diyabet grubuna ait kardiyomiyositlerde kontrole göre daha yavaş olduğu incelenmiştir.

Asit yüklenmesi durumundaki pH_i 'yi düzenleyen ana mekanizma NHE' dir (Lagadic-Gossmann ve ark., 1992). Diyabetik durumda hücreden NHE aracılı asit çıkışı, 6,85-7,45 pH_i aralıklarında hücre dışı NH_4Cl 'nin adım adım uzaklaştırılması ile hücre içi H^+ tamponlama kapasitesi hesaplanarak bulunmuştur (Le Prigent ve ark., 1997; Vaughan-Jones, 1990). Sonuçta, diyabetik durumda β_i 'nin kontrole göre değişmediği ve ayrıca hücreden NHE aracılı asit çıkışının diyabetik durumda kontrole göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (Le Prigent ve ark., 1997; Vaughan-Jones, 1990).

1.3.2. Hücre İçi pH Düzenleniminde Rol Alan Proteinler ve Diğer Yapılar

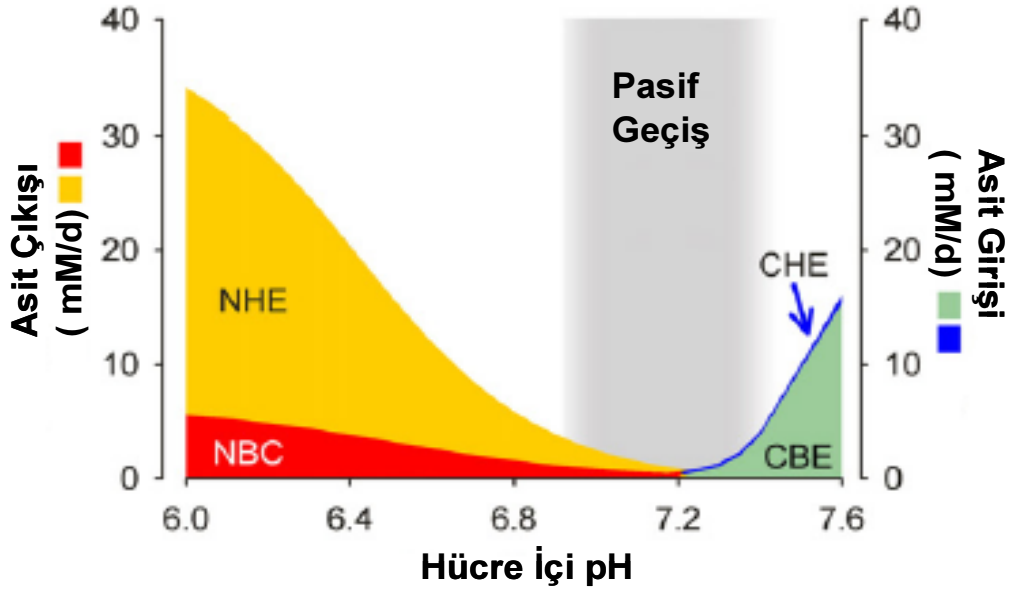
Memeli kalp ventrikül hücre zarlarında, hücre içi H^+ 'nin dengelenmesini sağlayan 5 tip taşıyıcı görevi yapan protein tanımlanmıştır (Lagadic-Gossmann ve ark., 1992; Xu ve ark., 1994; Leem ve ark., 1999; Poole ve ark., 1989). Bu taşıyıcı proteinler Şekil 1.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Ventrikül hücre zarında hücre içi H^+ düzenlenmesinde görevli taşıyıcı proteinlerin şematik olarak gösterimi. NHE: Na^+/H^+ değiş-tokuşçusu, NBC: Na^+/HCO_3^- ortak taşıyıcısı, CBE: Cl^-/HCO_3^- değiş-tokuşçusu, CHE: Cl^-/OH^- değiş-tokuşçusu, MCT: L^- : laktat/ H^+ ortak taşıyıcısı (Vaughan-Jones ve ark., 2009).

Şekil 1.3.' de gösterildiği gibi, hücre içinden asit çıkışını Na^+/H^+ değiş-tokuşçusu (NHE) ve Na^+/HCO_3^- ortak taşıyıcısı (NBC) sağlarken, hücre içine asit girişini ise, Cl^-/HCO_3^- değiş-tokuşçusu (CBE) ve Cl^-/OH^- değiş-tokuşçusu (CHE) sağlamaktadır. Laktat/ H^+ ortak taşıyıcısı (MCT) ise koşullara göre hem hücre içine asit girişini hem de hücre dışına asit çıkışını gerçekleştirmektedir (Vaughan-Jones ve ark., 2006).

Kalp ventrikül hücrelerinde eksprese edilen ve sarkolemmada bulunan, hücre içi H^+ konsantrasyonuna ($[H^+]_i$) bağlı olarak pH_i ' yi kontrol eden 4 adet temel mekanizma bulunmaktadır (Vaughan-Jones ve ark., 1988). Bu mekanizmalar Şekil 1.4.' de gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Ventrikül hücre zarında hücre içi pH'ya bağlı olarak hücreden asit çıkışının ve asit girişinin gösterimi. NHE: Na⁺/H⁺ değiş-tokuşçusu, NBC: Na⁺/HCO₃⁻ ortak taşıyıcısı, CBE: Cl⁻/HCO₃⁻ değiş-tokuşçusu, CHE: Cl⁻/OH⁻ değiş-tokuşçusu (Vaughan-Jones ve ark., 2009).

Şekil 1.4.' de gösterildiği gibi, düşük pH_i' de (yüksek [H⁺]_i) NHE ve NBC aktive olup, hücreden asit çıkışı gerçekleşirken, yüksek pH_i' de (düşük [H⁺]_i) CHE ve CBE aktive olup, hücreye asit girişi gerçekleşir (Leem ve ark., 1999). [H⁺]_i' na bağlı olarak bu 4 taşıyıcı tarafından H⁺ taşınımının kooperatif katsayısı 1' den büyüktür. Böylelikle hücrenin aşırı asit veya baz ile yüklenmesi durumunda güçlü bir koruma sağlanmış olur (Vaughan-Jones ve ark., 1988). Böyle bir yüklenim olmadığı durumda ise, dinlenme pH_i (~7,2) NHE ve NBC aracılığı ile asit çıkışının CBE ve CHE aracılığı ile asit girişiyle dengelenmektedir (Vaughan-Jones ve ark., 2006). Ayrıca pH' nın 7,2 olduğu durumda, hücreler arasında gedik-kavşaklar ile H⁺ pasif geçişi gerçekleşmektedir (Vaughan-Jones ve ark., 2009).

NHE, H⁺ i uzaklaştırarak, normal hücresel dengenin sağlanması için, pH_i' nin düzenlenmesinde önemli bir göreve sahiptir. NHE' nin bilinen 6 tipi bulunmaktadır. Kalpte en çok bulunanı NHE1' dir (Wakabayashi ve ark., 1997; Fliegel ve ark., 1993; Orłowski ve ark., 1997). NHE1, biri 500 amino asitten oluşan hücre zarını geçen bölge ve diğeri 315 amino asitten oluşan oldukça hidrofilik sitoplazmik

bölgeden meydana gelmektedir (Karmazyn ve ark., 1999). NHE' nin hücre zarını geçen bölgelerinin sayısı tiplerine göre farklılık göstermektedir. NHE1 12 tane hücre zarını geçen bölge (asit çıkışının sürdürülmesini sağlayan bölge) içermektedir. NHE' nin sitoplazmik bölgesi fosforilasyon-bağımlı reaksiyonların düzenlenmesinde önemlidir (Counillon ve ark., 1995). NHE1' in kalp atriyum ve ventrikül hücrelerinin interkala disk bölgelerinin olduğu yerlerde özellikle de koneksin 43' e yakın bölgelerde bulunduğu gösterilmiştir (Petrecca ve ark., 1999). NHE1' in bu lokalizasyonunun, hücreler arasında gedik-kavşaklar aracılığı ile iyon-bağımlı iletişimde etkili olduğu incelenmiştir. Özellikle de T-tübüllerde (transfer tübül) proton bağımlı olarak çalışan Ca^{2+} kanallarının aracılığıyla $[Ca^{2+}]_i$ düzenlenmesinde önemlidir (Petrecca ve ark., 1999).

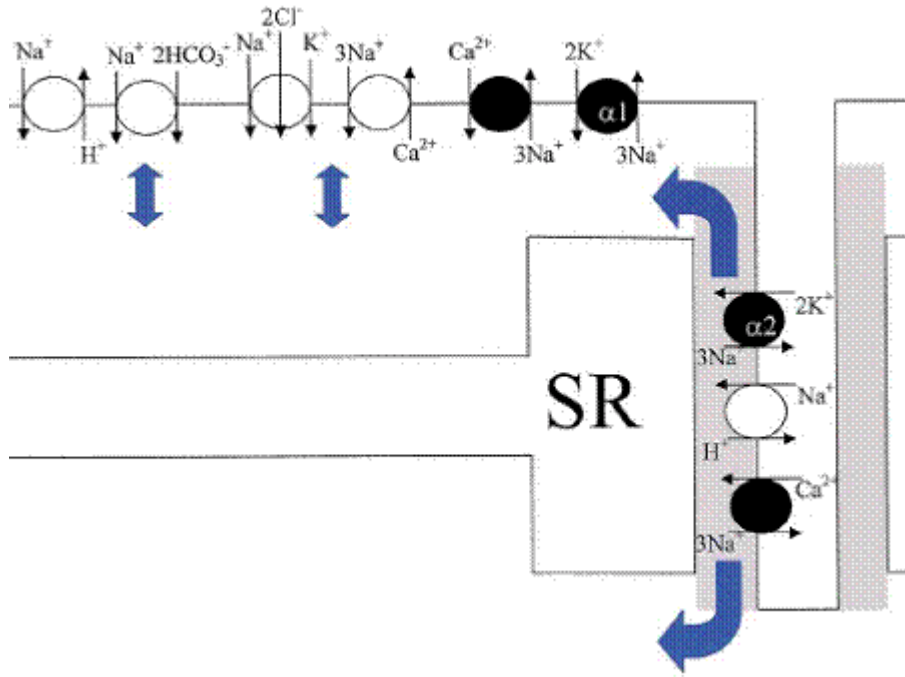
1.4. Hücre İçi Na^+ Düzenlenimi (Homeostazi)

1.4.1. Hücre İçi Na^+

Kalp kasılması, kalp hücrelerinin elektriksel olarak uyarılması ile başlar (uyarılma-kasılma çiftlenimi). Sinoatrial nodda başlayan depolarizasyon dalgası, atriyum ve atriyoventriküler noda ve oradan da ventriküle iletilir. Depolarizasyon dalgası ventrikül hücrelerine ulaştığı zaman voltaj-bağımlı Na^+ kanalları açılır (I_{Na}). Depolarizasyon sırasında, Ca^{2+} iyonu, L-tipi Ca^{2+} kanalları (I_{Ca}) aracılığı ile hücre içine girer. İçeri doğru oluşan bu akım aksiyon potansiyelinin plato evresinden sorumludur. Hücre içine Ca^{2+} girişi ile SR-RyR2 aracılığıyla daha fazla miktarda Ca^{2+} salınımına neden olur (Ca^{2+} indüklü Ca^{2+} salınımı) (Bers ve ark., 2003). Hücre içinde $[Ca^{2+}]_i$ artışı ile Ca^{2+} iyonu miyofilamentlere bağlanır ve kalp kasılması gerçekleşir.

Kalpte gevşeme sürecinde ise, $[Ca^{2+}]_i$ azalması ve miyofilamentlerde Ca^{2+} uzaklaşması ile olur (Bers, 2001; Bers ve ark., 2006). Sitoplazmadaki Ca^{2+} taşınımını SERCA ve hücre zarında bulunan NCX sağlar. NCX ile 1 Ca^{2+} iyonu hücre dışına taşınırken 3 Na^+ iyonu da hücre içine taşınır. Böylelikle hücre içinde $[Na^+]_i$ artışı olur

(yaklaşık olarak her bir AP sırasında $32 \mu\text{M}$ Na^+ hücre içine alınırken, L-tipi Ca^{2+} kanalları ile hücre içine giren $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} , un dışarı atılır). Ayrıca hücre içine Na^+ taşınması için hücre zarında NHE, $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ ortak taşıyıcısı, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ ortak taşıyıcısı bulunmaktadır. Bu şekilde hücre içinde artan $[\text{Na}^+]_i$, Na^+/K^+ pompası (NKA) tarafından hücre dışına pompalanır (Verdonck ve ark., 2003). Şekil 1.5.' de sarkolemmada bulunan ve hücre içine Na^+ taşıyan mekanizmalar gösterilmektedir.



Şekil 1.5. Hücre zarında bulunan Na^+ taşınım mekanizmalarının gösterimi. SR: sarkoplazmik retikulumu simgelemektedir (Verdonck ve ark., 2003).

NCX, hücreden Ca^{2+} atılımı için önemli olduğu kadar, hücre içine Ca^{2+} alımında ve dolayısıyla da SR'dan Ca^{2+} salımında da önemlidir. Termodinamik olarak, NCX ten hücre içine Ca^{2+} girişi, aksiyon potansiyelinin en erken fazında meydana gelir (Bers ve ark., 2001). Normal şartlar altında, NCX aracılığı ile hücre içine giren Ca^{2+} miktarı oldukça azdır. Ancak, NKA inhibisyonu veya anormal bir durumda NCX aracılığı ile hücre içine giren Ca^{2+} miktarı artar (Satoh ve ark., 1995).

Farklı genlerin ürünü olarak klonlanmış 3 farklı NCX izoformu bulunmaktadır (Nicoll ve ark., 1990; Nicoll ve ark., 1996). Bunlar NCX1, NCX2 ve NCX3 proteinleridir. Bu izoformlar biyofiziksel ve biyokimyasal olarak benzer özellikleri taşımalarına rağmen, gelişim sırasındaki ekspresyonları ve farklı dokularda bulunmalarından dolayı farklılık gösterirler (Pulina ve ark., 2006). NCX1, kalp ve iskelet kasında yüksek seviyelerde eksprese edilmektedir. NCX2, beyin ve spinal korda eksprese edilmektedir. NCX3 ise, beyin ve iskelet kasında eksprese edilmektedir (Frayse ve ark., 2001; Quednau ve ark., 2004). NCX1 9 tane hücre zarını geçen bölge içermektedir. Bu bölgelerde 5 tanesi NH₂ kısmında (N-terminal kısım) bulunurken, diğer 4 tanesi COOH kısmında (C-terminal kısım) bulunmaktadır. Hücre zarını geçen bu 2 bölge de iyonların bağlanmasında ve taşınmasında önemli göreve sahiptirler. Hücre içinde bulunan yaklaşık 550 amino asit içeren bir ilmek tarafından birbirlerinden ayrılmışlardır (Nicoll ve ark., 1999). Bu ilmek, Na⁺ ve Ca²⁺ translokasyonundan sorumlu değil iken, değiş-tokuşunun aktivitesinin kontrolünden sorumludur.

NCX büyük bir hücre zarı protein ailesinin üyesidir (NCX ailesi, NCKX ailesi ve Bakteriyel aile) (Philipson ve ark., 2002). Bu ailenin üyeleri yapılarında bulunan α -tekrarı bölgesinin varlığına göre belirlenmişlerdir. α -tekrarı, hücre zarını geçen bölgelerde, moleküller arası homoloji gösteren bölgedir (Schwarz ve ark., 1997). Taşınımı yapılan Na⁺ ve Ca²⁺ (Matsuoka ve ark., 1995; Matsuoka ve ark., 1997), pH_i (Doering ve ark., 1993), metabolik bileşenler [ATP, fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (PIP₂), protein kinaz A (PKA) ve protein kinaz C (PKC)] (He ve ark., 2000; Iwamoto ve ark., 1998), redoks ajanları, hidroksil radikaller, H₂O₂ ve OH (Santacruz-Toloza ve ark., 2000) NCX kontrolünden sorumludurlar (Annunziato ve ark., 2004).

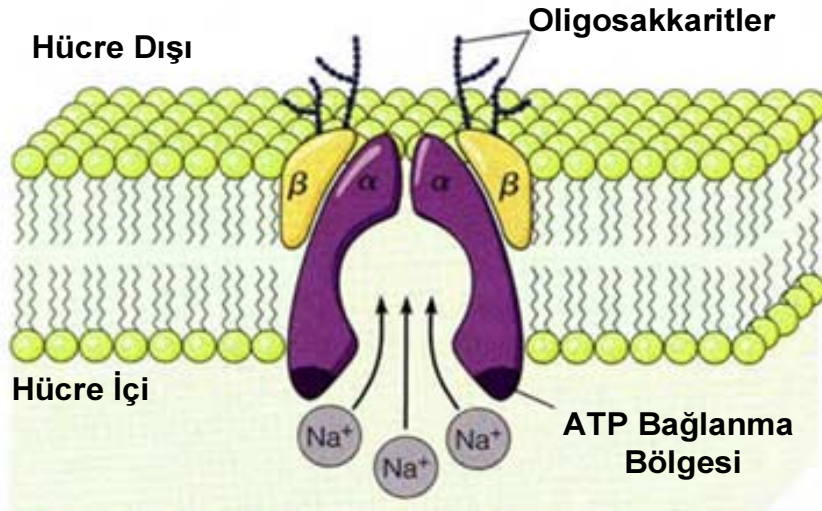
Kasılma durumunda, NCX geri moda çalışır. Yani, 1 Ca²⁺-iyonunu hücre içine taşıırken (kendi gradiyenti ile) 3 Na⁺-iyonunun hücre dışına doğru taşınımını sağlar. Böylece, değiş-tokuşunun ileri durumu (forward mode, içeri doğru I_{NCX}) Ca²⁺ un hücre dışına çıkışını, gerimodu (reverse mode, dışarı doğru I_{NCX}) ise, Ca²⁺ un hücre içine girişini sağlar (Maack ve ark., 2006).

NCX, hücreden Ca^{2+} atılımı için önemli olduğu kadar, hücre içine Ca^{2+} alımında ve dolayısıyla da SR'dan Ca^{2+} salımında da önemlidir. Termodinamik olarak, NCX ten hücre içine Ca^{2+} girişi, aksiyon potansiyelinin en erken fazında meydana gelir (Bers ve ark., 2001). Normal şartlar altında, NCX aracılığı ile hücre içine giren Ca^{2+} miktarı oldukça azdır. Ancak, NKA inhibisyonu veya anormal bir durumda NCX aracılığı ile hücre içine giren Ca^{2+} miktarı artar (Satoh ve ark., 1995).

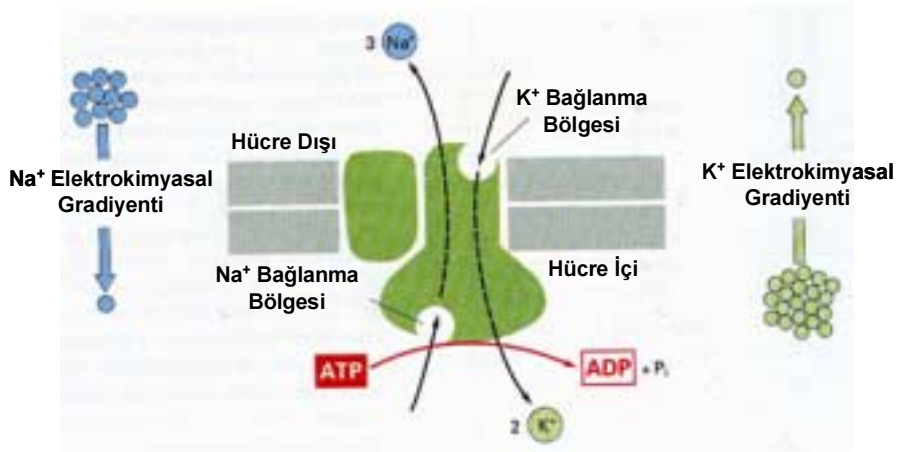
Aksiyon potansiyeli sırasında NCX ile içeri giren Ca^{2+} miktarı azdır ancak bu miktarın sarkoplazmik retikulumdan Ca^{2+} salınımı için yeterli olduğu gösterilmiştir (Litwin ve ark., 1998). Ayrıca, aksiyon potansiyelinin plato fazında NCX' in içeri doğru akımının çok az etkili olduğu da incelenmiştir (Janvier ve ark., 1996). KBR-7943 (KBR), NCX in Ca^{2+} un içeri giriş modunu yani geri modunu, ileri moduna göre daha iyi inhibe etmektedir. NKA inhibisyonunun hücre içi Na^+ ve buna bağlı olarak da hücre içi Ca^{2+} artışına neden olur. Sonuçta, pozitif inotropik etki veya Ca^{2+} overloadu ve aritmi gözlenir (Satoh ve ark., 2003). Bu çalışmada, strophantidin kullanılarak NKA inhibisyonu gerçekleştirilerek Ca^{2+} transiyentinde bir artış olduğu ve sonrasında ortama KBR eklendiği zaman bu artışın normale döndüğü gösterilmiştir.

NKA, sodyum ve potasyum iyonlarının konsantrasyon gradiyentlerini, zar potansiyelinin stabilizasyonu ve kalp kasılmasının düzenlenmesi için kontrol eder. $[Na^+]_i$ konsantrasyonunun kontrolü, uyarılma-kasılma çiftleniminde önemli bir rol oynayan NCX in düzenlenmesi için önemlidir (Semb ve ark., 1998). NKA, α (~110 kDa) ve β (~55 kDa) olmak üzere iki alt birimden oluşur (Semb ve ark., 1998). Sıçan kalp hücresinde α alt birimi iki tane iken β alt birimi bir tane olarak eksprese edilir. NKA nın iki alt birimi de NCX aracılığı ile Ca^{2+} dengesinde önemlidirler. Ancak, α_2 alt biriminin Ca^{2+} dengesinde daha çok önemli olduğu gösterilmiştir (Yamamoto ve ark., 2005). NCX, t-tubulerinde daha çok bulunduğundan NKA α alt birimlerinin hücre zarında farklı dağıldıkları düşünülmüştür (Yamamoto ve ark., 2005). Swift ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmada, α_2 alt biriminin t-tubulerinde sarkolemmaya göre daha çok bulunduğunu göstermişlerdir. Ayrıca NKA inhibisyonu ile ölçtükleri

hücre içi Na^+ un arttığını ve dolayısıyla kasılmanın arttığını da göstermişlerdir. Şekil 1.6.' da NKA' nın yapısı şekil olarak gösterilmektedir.



Şekil 1.6. Kalp hücre zarında bulunan NKA' nın yapısal olarak gösterimi. α ve β alt birimlerini simgelemektedir (Alberts,2008).



Şekil 1.7. Kalp hücre zarında bulunan NKA' nın çalışma prensibinin gösterimi. (Alberts,2008).

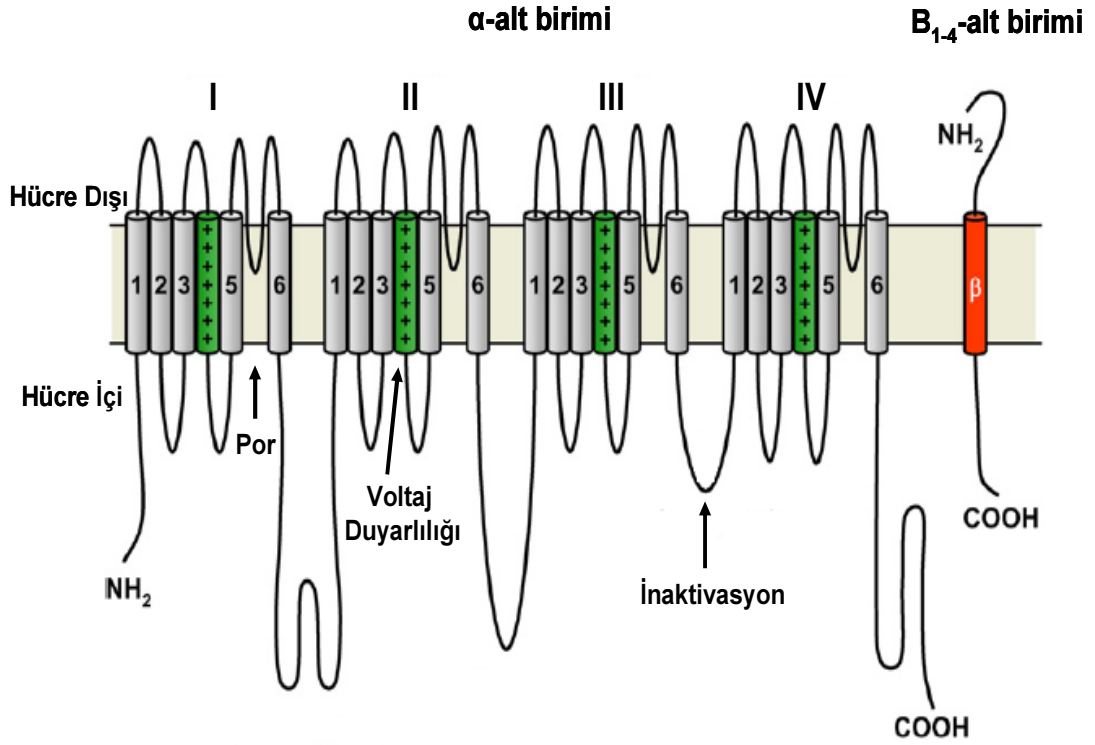
Na^+ elektrokimyasal gradiyenti NKA tarafından sürdürülür. NKA, ATP hidrolizinden elde ettiği enerji ile hücre içi Na^+ -iyonunun hücre dışı K^+ -iyonu ile değiş tokuşunu sağlar. Dolayısıyla, NKA, Na^+ ve K^+ konsantrasyon gradiyentlerini, zar potansiyelinin stabilizasyonu ve kalp kasılmasının düzenlenmesi için önemli göreve sahiptir. Şekil 1.7.' de NKA' nın çalışma prensibi şekil üzerinde özetlenmiştir. Despa ve arkadaşları (2002) yaptıkları çalışmada, SBFI boyası kullanarak ölçtükleri hücre içi Na^+ konsantrasyonunun sıçan kalp hücresinde tavşan kalp hücresindeki miktara göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Bu artışın sebebinin de hücre içi Na^+ girişinin daha yüksek olmasından ve NKA pompalama hızının daha yüksek olmasından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir.

NKA aktivasyonunun inhibe olması durumunda, $[\text{Na}^+]_i$ arttığı incelenmiştir (Despa ve ark., 2003). NKA' nın tekrar aktive olması ile, pompa akımının (I_{pump}) transient şeklinde, 2 fazlı olarak yükseldiğini göstermişlerdir. Bu fazlardan ilkinin $[\text{Na}^+]_i$ ' daki küçük değişikliklerle oluşan hızlı faz, ikincisinin ise, $[\text{Na}^+]_i$ ' daki azalma ile oluştuğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, I_{pump} ' daki hızlı azalmanın bölgesel olarak subsarkolemmal $[\text{Na}^+]_i$ ' daki azalmadan da kaynaklanabileceği açıklanmıştır.

NKA fonksiyonunun PKC-bağımlı düzenlenmesinde, fosfolambanın (PLM) bir rolü olup olmadığı üzerine yapılan bir araştırmada, PDBu (fosfolamban agonisti) kullanılarak $[\text{Na}^+]_i$ ve I_{pump} ölçülmüştür (Han ve ark., 2006). Kontrol kardiyomiyositlerinde, PDBu aracılığıyla PLM fosforilasyonunun arttığı ve $[\text{Na}^+]_i$ ' nun azaldığı gösterilmiştir. PLM eksprese etmeyen farelerden elde edilen kardiyomiyositlerde ise, PDBu' nun NKA-başlatıcılı Na^+ çıkış hızının değişmediği incelenmiştir. Dolayısıyla, PLM' nin PKC-bağımlı NKA aktivasyonunu düzenlediğini ileri sürmüşlerdir.

Çeşitli elektriksel uyarılabilir hücrelerde, voltaj-kapılı Na^+ kanalları, aksiyon potansiyelinin hızlı depolarizasyon evresinden sorumludur. Sitolik Ca^{2+} konsantrasyonunun Na^+ kanal biyosentezini düzenlediğine dair araştırmalar yapılmıştır (Sherman ve ark., 1985, Chiamvimonvat ve ark., 1995). İzole sıçan kalp ventrikül hücrelerinde ölçülen hücre içi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konsantrasyonundaki değişikliğin Na^+

akım yoğunluğunda bir değişikliğe sebep olduğu, buna karşılık, Na^+ akım yoğunluğundaki değişikliğin $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konsantrasyonunda bir değişikliğe sebep olmadığı gösterilmiştir (Chiamvimonvat ve ark., 1995). Şekil 1.8.' de voltaj-kapılı Na^+ kanalının yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.8. Hücre zarında bulunan voltaj-kapılı Na^+ kanalının yapısının gösterimi. (Yu ve ark.,2003; Abriel, 2007).

Şekil 1.8.' de gösterildiği gibi, voltaj-kapılı Na^+ kanalı, moleküler ağırlığı 220 kDa olan ve 2015 ya da 2016 amino asit içeren bir hücre zarı proteinidir. α ve β olmak üzere 2 alt birimden oluşmaktadır (Abriel, 2007). α alt birimi, birbiriyle homolog olan 4 tane yapıdan oluşur. Her bir yapı ise, 6 tane hücre zarını geçen proteinden oluşmaktadır. Hücre zarını geçen 4. cü bölüm, kanalın aktivasyon kapısını içeren, voltaj sensörünün bulunduğu bölümdür. Kanalın 3. cü ve 4. cü yapılarının arasında, sitoplazmada kalan ilmekli bölge ise, kanalın inaktivasyonundan sorumludur. β alt birimlerinin ise, moleküler ağırlıkları yaklaşık olarak 30-35 kDa arasında değişmektedir. Hücre zarını geçen bir bölümden oluşmaktadır (Yu ve ark.,2003; Abriel, 2007). Kalp sol ventrikülündeki iyon kanallarının gradientleri kalp

fonksiyonunda önemli bir role sahiptir (Antzelevitch ve ark., 1999). Özellikle de hücre zarı repolarizasyonunun değişmesine neden olurlar. Ashamalla ve arkadaşları (2001), sıçan kalp left ventrikül endokard ve epikard dokusundan ve karşılaştırma için de sağ ventrikül hücrelerinden Na^+ akımı ölçmüşlerdir. Sol ventrikül epikard hücrelerindeki Na^+ akım yoğunluğunun sol ventrikül endokard ve sağ ventrikül hücrelerine göre daha düşük olduğunu göstermişlerdir.

1.4.2. Hücre İçi Na^+ ve Ca^{2+} İlişkisi

Ca^{2+} , kalp fonksiyonunun kontrolü için önemli bir iyonudur. Kardiyomiyositlerin SR ve sarkolemması, Ca^{2+} düzenleniminin sürdürülmesinde önemli olan bileşenlerdir (MacLennan ve ark., 2002). Yeung ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmada, iskemi/reperfüzyon sırasında sıçan kalplerinden izole edilmiş kardiyomiyositlerde artan hücre içi Ca^{2+} seviyesinin kronik aralıklı hipoksi (CIH) ile normale döndüğünü incelemişlerdir. Ayrıca, SR' dan RyR aracılığı ile Ca^{2+} salınım ve sarkolemmal NCX aracılığı ile de Ca^{2+} çıkış hızının CIH durumunda arttığını göstermişlerdir. Böylelikle CIH' nin özellikle iskemi/reperfüzyon durumu için bir kalp koruyucusu görevinin olduğunu ileri sürmüşlerdir (Chen ve ark., 2006).

Kasılmanın uzunluk bağımlı modülasyonu, kalbin pompalama fonksiyonunun belirlenmesi için önemli bir göreve sahiptir. Vücuttan toplanan kanın kalbe geri dönmesindeki artış, diyastolik hacimde artışa neden olur. Böylelikle de, *in vivo* olarak kalp çıktısı artar (Lakatta, 1992). Hongo ve arkadaşları (1996) yaptıkları çalışmada, sıçan kalp ventrikül hücrelerinde gerim ile oluşturdukları kasılmanın genliğinin ve kasılma süresinin arttığını incelemişlerdir (Allen ve ark., 1982; Allen ve ark., 1988). Bu kasılmaya bağlı olarak ölçtükleri Ca^{2+} transienlerinin zamansal değişiminde herhangi bir değişiklik meydana gelmediğini ve $[\text{Na}^+]_i$ 'unda da bir değişiklik oluşmadığını araştırmışlardır.

Hücre zarının pozitif potansiyellerinde, Ca^{2+} geçişinin ("trigger flux") I_{Ca} aracılı Ca^{2+} geçişine göre daha fazla olduğu incelenmiştir (Sobie ve ark., 2008).

Bunun sebebinin ise, L-tipi Ca^{2+} kanalları aracılığı ile hücreye giren Ca^{2+} , un NCX' in bağlanma bölgesine bağlanması ile NCX aracılığı ile hücre içine Ca^{2+} girişinin artması gerçekleşmektedir (Hilgemann ve ark., 1992; Miura ve ark., 1989). L-tipi Ca^{2+} kanalının inhibe edilmesi durumunda ise, kontrole göre daha az Ca^{2+} girişinin olduğu incelenmiştir (Sobie ve ark., 2008).

Her bir AP sırasında, Ca^{2+} , L-tipi Ca^{2+} kanalı aracılığıyla hücre içine girmektedir. Hücre içine giren Ca^{2+} , SR' dan RyR aracılığı ile Ca^{2+} salınımını tetiklemektedir (Fabiato ve ark., 1978; Marks ve ark., 2000). Böylelikle Ca^{2+} transienleri oluşmaktadır (Eisner ve ark., 2000). Kararlı durumda, hücre içindeki Ca^{2+} , SERCA tarafından SR içine alınarak ve NCX ile hücre dışına taşınarak denge sağlanmış olur (Barry ve ark., 1993; Bers ve ark., 1989). Hücre içine Ca^{2+} girişi ve SR' dan Ca^{2+} salınımı sonucunda oluşan Ca^{2+} transienleri farklı türlerde değişiklik gösterirler (Bers ve ark., 2002; Maier ve ark., 2000; Sham ve ark., 1995). Bu farklılıklar, AP süresine, SERCA aktivitesine ve NCX aktivitesine bağlı olarak meydana gelmektedir (Bers ve ark., 2002).

Kalp AP süresindeki değişiklikler kalbin kasılmasını önemli derecede düzenleyebilmektedir (Wood ve ark., 1969; Morad ve ark., 1973; Allen ve ark., 1977; Wohlfart ve ark., 1979; Schouten, 1986). AP süresi ve kasılma arasındaki bu ilişki özellikle memeli kalp ventrikülünde pozitif inotropik etki mekanizması üzerinde incelenmiştir (Bouchard ve ark., 1995). Voltaj-kapılı Ca^{2+} kanalları aracılığı ile hücre içine Ca^{2+} girişindeki artış (Morad ve ark., 1987; Cleeman ve ark., 1991; Sham ve ark., 1995), NCX aracılığı ile hücre dışına Ca^{2+} çıkışındaki değişiklikler (London ve ark., 1986; Bouchard ve ark., 1993; Bers ve ark., 1991) miyofilamentler için sağlanacak olan Ca^{2+} miktarında bir değişikliğe neden olabilir. Bu durum, SR' ın Ca^{2+} ile yüklenmesi sonucunda, $[Ca^{2+}]_i$ artışının bir sonucu da olabilir (Fabiato ve ark., 1985; Wier ve ark., 1990).

Hattori ve arkadaşları (2000) yaptıkları çalışmada, STZ uygulamalı diyabet olmuş sıçanların kalplerinden izole edilen kardiyomiyositlerde NCX fonksiyonunun azaldığını incelemişlerdir. Çalışmada, NCX akımını, NCX protein seviyesini ve

NCX mRNA seviyesini (Kofuji ve ark., 1992; Quednau ve ark., 1997) ölçmüşlerdir. NCX akım yoğunluğunun ve NCX protein seviyesinin diyabet durumunda azaldığını, insülin tedavisi ile bu azalmaların normale döndüğünü incelemişlerdir. Böylelikle, kalp NCX fonksiyonunun diyabet durumunda azalmasının sebebinin düşük insülin seviyesinin ve hipergliseminin bir sonucu olduğunu ileri sürmüşlerdir.

1.4.3. Kalple İlgili Patolojilerde Hücre İçi Na^+ Düzenlemesinin Rolü

Kalp yetmezliği modelinde, artan hızlardaki kasılmadaki azalış (-kuvvet-frekans ilişkisi; -FFR) kasılmadaki karakteristik bir değişikliktir. Normal kalpte ise, artan hızlardaki kasılmada artış (+kuvvet-frekans ilişkisi; +FFR) gözlemlenmektedir (Pieske ve ark., 1995). Mills ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmada, Artan hızlarda kasılmanın kontrol kardiyomiyositlerinde sürdürüldüğünü ancak, kalp yetmezliği durumunda, kasılmanın azaldığını incelemişlerdir. Ayrıca, ölçtükleri $[\text{Na}^+]_i$, AP ve I_{Ca} sonuçlarına bağlı olarak kalp yetmezliği modelindeki kardiyomiyositlerde artan $[\text{Na}^+]_i$ ' un kasılmaya bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

İskemi durumundaki kalpde $[\text{Na}^+]_i$ 'unda artış, reperfüzyon durumunda ise, çeşitli normale dönme durumlarını takiben $[\text{Na}^+]_i$ ' unda yine bir artış olduğu incelenmiştir (Hove ve ark., 2007; Murphy ve ark., 1991; Tani ve ark., 1989; Xiao ve ark., 1999). NHE1 inhibitörü olan amilorid ve voltaj-kapılı Na^+ kanal inhibitörü olan TTX kullanıldığı durumda, iskemideki $[\text{Na}^+]_i$ ' daki artışın önlendiği gösterilmiştir (Williams ve ark., 2007). Sonuç olarak da, iskemi durumunda I_{NaP} ' nin hücre içine Na^+ girişinden sorumlu olduğunu, reperfüzyon durumunda ise, NHE' nin sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Kalbin yeterli miktarda kan ile beslenememesi durumunda (sol koroner arter ligasyon yöntemi ile) meydana gelen kalp infarktüsü sırasında, NCX aktivitesi ile $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ' daki azalma kontrol kardiyomiyositlerinde de benzer olduğu incelenmiştir (Gomez ve ark., 2001). Sonraki yapılan çalışmada ise, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değiş-tokuşçusu akımının (I_{NaCa}) kalp infarktüsü durumundaki sıçanlardan izole edilen

kardiyomiyositlerde kontrole göre daha büyük olduğu incelenmiştir (Gomez ve ark., 2002). Bu 2 çalışmadaki farklılığın sebebinin ise, NCX elektrojenitesindeki bir farklılığın Ca^{2+} taşınımını etkilemediği, hücrenin Ca^{2+} tamponlama kapasitesindeki bir değişikliğin olabileceği ve son olarak da hücrelerin yüzey-hacim ilişkilerindeki bir kaymanın olabileceği ileri sürülmüştür (Gomez ve ark., 2002).

Kalp fizyolojisinin ve patolojisinin anlaşılmasında NCX inhibitörleri kullanılarak çalışmalar yapılmıştır (Watanabe ve ark., 2006). Örneğin iskemi/reperfizyon durumunda hücre içi Na^+ artışı NCX in geri modundan kaynaklanmaktadır. Bu da hücre içi Ca^{2+} artışına ve hücrenin zarar görmesine ve hücre ölümüne neden olur (Murphy ve ark., 1999). Böylelikle farmakolojik olarak NCX in geri modunun inhibe edilmesinin (SEA0400) hücre içi Ca^{2+} birikiminin önlenmesine ve dolayısıyla SEA0400 ün kalpte koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Feng ve ark., 2006).

Bazı kalp yetmezliği modellerindeki $[Na^+]_i$ artışı düşük NKA aktivitesi ile açıklanmıştır (Charlemagne ve ark., 1994). Buna bağlı olarak, NKA ekspresyonunun azaldığı ve izoformlarının değiştiği ileri sürülmüştür (Schwinger ve ark., 1999). Despa ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları çalışmada, tavşan kalp yetmezliği durumunda, diyastolik Na^+ girişinin artmasına bağlı olarak ve NKA özellikleri değişmeden hücre içi Na^+ arttığını göstermişlerdir. Ayrıca, $[Na^+]_i$ artmasıyla $[Ca^{2+}]_i$ transienlerinin azaldığı ve aksiyon potansiyeli süresinin uzadığını ileri sürmüşlerdir.

Kalp hipertrofisi ve kalp yetmezliği durumunda artan $[Na^+]_i$ sebebinin hücre içine Na^+ girişindeki artışın ve I_{pump} ' nın Na^+ a olan duyarlılığındaki azalma olabileceği de araştırılmıştır (Verdonck ve ark., 2003). Bu sonuca ise, hipertrofik durumda I_{pump} ' nın Na^+ aktivasyon eğiminin sağa kaymasından, I_{pump} ' nın sessiz hücrelerde büyük olmasından, $[Na^+]_i$ ' un yüksek olmasından yola çıkarak ileri sürmüşlerdir. Literatürde, iskemi durumunda NHE' nin fonksiyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda 2 farklı görüş mevcuttur (Allen ve ark., 2003). İlk görüş, iskemi durumunda oluşan büyük hücre içi asidoz sebebiyle NHE' nin hücre dışına asit

çıkışını sağlayacak şekilde çalıştığıdır (Shen ve ark., 1972). Diğer görüş ise, iskemi durumunda NHE' nin inhibe olduğudur (Park ve ark., 1999; Baetz ve ark., 2003).

Darmellah ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmada, Tip-2 diyabet modeli ile hipertrofi olmuş sıçan kalplerinden (Jandeleit-Dahm ve ark., 2000) izole edilen kardiyomiyositlerde, NHE' nin nasıl etkilendiğini incelemişlerdir. Sonuçta NHE aktivitesinin hipertrofik durumda arttığını ileri sürmüşlerdir. Mekanizma olarak da şöyle bir model düşünülmüştür: pH_i ' ye bağlı olarak hipertrofi durumunda $[Na^+]_i$ artışının oluşmasını takiben, NCX aracılığı ile $[Ca^{2+}]_i$ artışı gözlenilmiştir. Artan $[Ca^{2+}]_i$ ' nu NHE aktivitesini artırmıştır. NHE aktivitesindeki artış ise, hipertrofinin gelişmesine neden olan Akt' nin fosforilasyonuna neden olmuştur.

1.5. Diyabet Hastalığı

1.5.1.Genel Bilgiler

Tıpta *Diabetes Mellitus* olarak adlandırılan diyabet hastalığı, insülin eksikliği ve insülin etkinliğinin bozulması sonucu oluşan açlık kan şekeriindeki yükselme ve glikoz toleransının bozulması ile karakterize edilir (Johnson ve ark., 1990). Diyabet hastalığı, Amerikan Diyabet Derneği (American Diabetes Association) tarafından etiyolojisine, tarihçesine ve kliniksel olarak kendisini göstermesine göre iki sınıfa ayrılmıştır. Birincisi; insüline bağlı diyabet hastalığı (IDDM, tip 1 diyabet), ikincisi ise; insüline bağlı olmayan diyabet (NIDDM, tip 2 diyabet) hastalığıdır.

Tip 1 diyabet her yaştaki insanlarda görülebilir olmasına rağmen daha çok çocuklarda ve genç yetişkinlerde görülür. Bu hastalığın kesin sebepleri çeşitli olup henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Ancak tip 1 diyabetin yaygın olarak kabul edilen oluşma sebebi pankreasın langerhans adacıklarındaki β hücrelerinin otoimmün olarak yıkılmasıdır (Taylor ve ark., 1994).

Hastalığın etiyojisi de karışık olup tam olarak anlaşılmamış olmasına rağmen tip 1 diyabete genetiksel olarak yatkınlığı olan kişiler için çevresel faktörler önemli tetikleyicidirler. Tip 1 diyabete olan hassasiyetlik birçok genin farklı bölgelerine bağlıdır. Genetiksel yatkınlığın önemli bir bileşeni “tip 1 diyabet bölgesi” olarak yeni isimlendirilen 6. kromozomun kısa kolunda bulunan insan lökosit antijen (HLA) geninde kodlanmaktadır. HLA antijenleri hücre yüzeyinde bulunan glikoproteinlerdir (Bracken ve ark., 2003).

Tip 1 diyabet insülin üretiminin kaybolması ile karakterize edilir ve plazmada dolaşan insülin azalmasıyla sonuçlanır. İnsülin eksikliği katekolaminler, kortizol, glukagon ve büyüme hormonları gibi enerji üretimini sağlayan-düzenleyici hormonların varlığında yağ dokusundaki yağ yıkımını artırır. Sonuçta oluşan yağ asitleri dolaşıma katılır ve karaciğerde keton taneciklerine, asetoasidik asite ve 3-hidroksibütirik asite parçalanır. Poliüri, kilo kaybı, kramplar ketoasidozis belirtileri olup, önlem alınmadığı takdirde diyabetik komaya ve bazen de ölüme sebep olabilmektedir. Bu yüzden, hiperglisemi ve ketoasidozis sonucu oluşabilecek hayati tehlikeyi önlemek için tip 1 diyabetli hastalar sürekli insüline ihtiyaç duyarlar (Von Boehmer ve ark., 2004).

Tip 2 diyabet, en yaygın olan diyabet tipidir ve daha çok yetişkinlerde görülür. Bu diyabetin oluşmasında genlerin etkili olması yanında çevresel faktörler de önemlidir. Aşırı şişmanlık, yaş artışı, etnik ve yaşanan bölge çeşitliliği tip 2 diyabetin sahip olduğu kliniksel risk faktörleri içinde bulunmaktadır. Tip 2 diyabet insüline direnç ve bağıl insülin yetmezliği ile karakterize edilmektedir. Hastalar genellikle normal insülin düzeyine sahiptirler. Hastalığın sahip olduğu kusurlar pankreastan kaynaklanmayıp, insülin reseptöründeki ve reseptör sonrası düzeydeki hücrel direncin tipik bir örneğidir (Bracken ve ark., 2003).

Tip 2 diyabetin oluşum nedenleri şöyle sıralanabilir; a) Beta hücreleri üzerindeki glukoreseptörlerde meydana gelen bir bozukluk sonucu glukoz aracılığıyla bu reseptörlerin uyarılmasına bağlı olarak oluşan insülin salgılanmasının azalması; b) beta hücrelerine giren glukozun orada öteki uyarıların insülin salıverici

etkilerini güçlendirme yeteneğinin azalması (Campbell,1984); c) insülin reseptörlerinin sayısının azalması (Weir,1982); d) Anti insuliner sistemin egemen duruma geçmesidir. Yapılan istatistikler Tip 2 diyabetin genellikle obezite ve kalıtımla ilgili olduğunu ortaya koymuştur (Porte ve ark.,1981).

1.5.2. Deneysel Diyabet Modeli

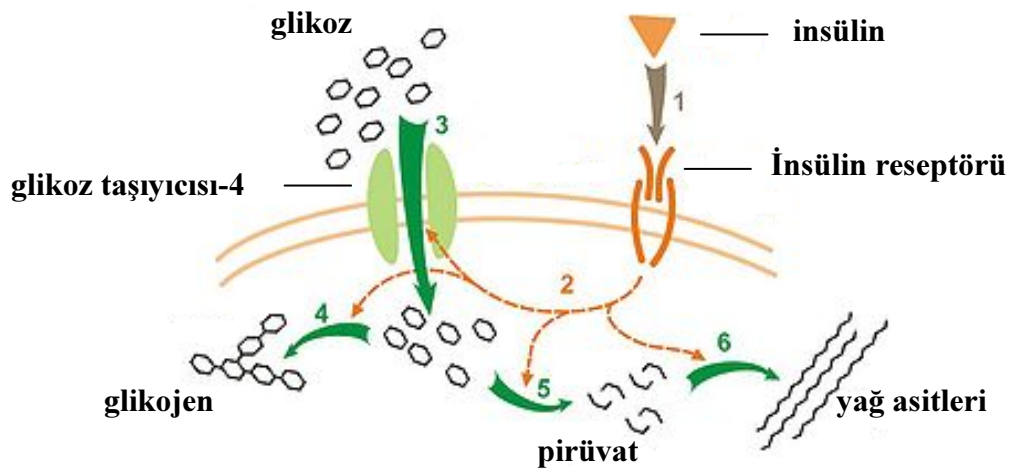
Diabetes Mellitus'taki en önemli hormonal bozukluğun mutlak ya da kısmi insülin eksikliği olduğunun anlaşılması deneysel diyabet oluşturulmasında temel teşkil etmiştir. Deneysel diyabet, pankreotektomi ya da pankreasın beta hücrelerinin kimyasal maddelerle tahrip edilmesiyle oluşturulmaktadır.

Diyabetin neden olduğu komplikasyonların incelenmesinde ve bunların tedavi örneklerinde deneysel olarak gerçekleştirilen diyabet modelleri önemli yer tutmaktadır. Ayrıca deneysel diyabet ile elde edilen avantajlara ve uygulama örneklerine bakıldığında bu modellerin çok daha önemli olduğu görülmektedir. Deneysel yöntemle diyabet yapmak için pek çok yol olmasına karşın, kimyasal kullanarak diyabet modeli yapma yolu oldukça sık kullanılmaktadır. Kimyasal yollu diyabet için kullanılan iki ajandan streptozotosin ve alloksan düşünüldüğünde nekrotik gelişimler göstermediğinden dolayı streptozotosin (STZ) daha çok tercih edilen kimyasal ajandır (Tomlinson ve ark, 1992).

Birçok deneysel model, tip 2 diyabetin kendiliğinden oluşmasını sağlayan genetiksel yatkınlığa sahiptir. Ancak tip 2 diyabetin genetiksel olarak bağlı olduğu komplikasyonların üstesinden gelebilmek için yine kimyasallarla oluşturulan diyabet modeli kullanılmıştır. STZ kullanılarak oluşturulan tip 1 ve tip 2 diyabetlerde ilk birkaç günde oluşan geçici kan şekerinde yükselme ve pankreatik insülinin salınımında azalma, pankreatik β -hücrelerinin yıkımıyla birlikte meydana gelen değişikliklerdir. (Bracken ve ark., 2003).

1.5.3. Tip -1 Diyabet ve İnsülin İlişkisi

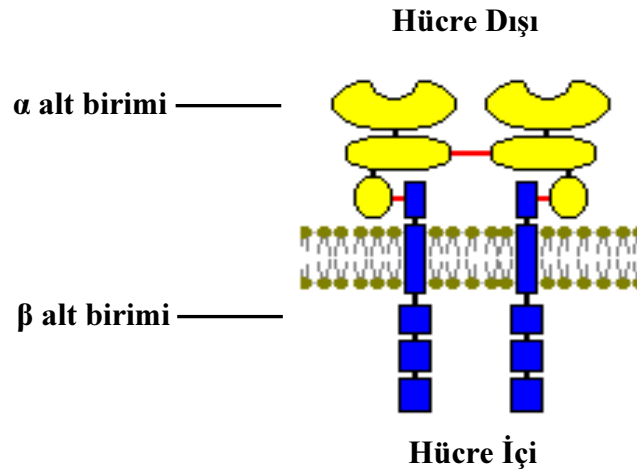
İnsülin karbohidrat metabolizmasında, yağ metabolizmasında ve protein metabolizmasında önemli etkiye sahip olan bir hormondur (Duckworth ve ark., 1998). Karbohidrat metabolizmasında şöyle görevleri vardır: A) Kas ve yağ dokusunda hücre zarından glikozun taşınımını artırır. B) Kas ve yağ dokusunda glikolizi artırır. C) Kas, karaciğer ve yağ dokusunda glikojen sentezi hızını uyarır. D) Karaciğerde glikojenoliz hızını inhibe eder. Yağ metabolizmasında şöyle görevleri vardır: A) Yağ dokuda lipoliz hızını azaltır ve böylelikle plazma yağ asit seviyesini düşürür. B) Dokularda yağ asiti ve triaçilgliserol sentezini uyarır. C) Karaciğerde düşük yoğunluklu lipoproteini artırır. D) Kandan kas ve yağ dokusu içine trigliserid alımını artırır. E) Kas ve karaciğerde yağ asit oksidasyon hızını azaltır. Protein metabolizmasında ise şöyle görevleri vardır: A) Bazı amino asitlerin dokular içine alımını artırır. B) Kas, karaciğer, yağ ve diğer dokularda protein sentezi hızını artırır. C) Kasta protein parçalanma hızını azaltır (Newsholme ve ark, 2001) (Şekil 1.9.).



Şekil 1.9. İnsülinin metabolizmadaki etkisi. 1: İnsülinin kendi reseptörüne bağlanması. 2: İnsülin reseptörünün diğer yolları başlatması. 3: Glikozun hücre içine alımı. 4: Glikojen sentezi. 5: Yağ asit sentezi.

İnsülin hücre içine glikoz taşınımını hücre zarında bulunan insülin reseptörlerine bağlanarak başlatır. İnsülin reseptörü bir transmembran (hücre zarını geçen) proteindir. Tirozin kinaz reseptör sınıfına ait bir reseptördür (Kumar ve ark., 2005). Yani fonksiyonu bir enzime benzer. ATP deki fosfat grubunu hücre içi hedef

proteinin tirozin bölgelerine taşır. İnsülin reseptörü, disülfid bağları ile bağlı olan iki alfa alt birimi ve iki beta alt birimi içermektedir. Alfa alt birimi hücre dışında bulunup, insülin bağlanma bölgesi içerir. Beta alt birimi ise, hücre içinde bulunup, ATP-bağlama ve tirozin kinaz bölgesi içerir. İnsülinin alfa alt birimine bağlanması ile beta alt biriminin fosforilasyonu (otofosforilasyon) gerçekleşir. Böylece, reseptörün katalitik bölgesi aktive olur. Aktive olan reseptör ise, hücre içindeki hedef proteinlerin fosforilasyonunu sağlar (Ward ve ark., 2009) (Şekil 1.10.).



Şekil 1.10. İnsülin reseptörünün yapısı.

Tip-1 diyabet, diğer bir adıyla insülin bağımlı diyabet, pankreastaki insülin salgılayan β -hücrelerinin yıkımı ile meydana gelir. İnsülin eksikliği bu tip diyabette kan şekerinde bir artış gözlenir. Ayrıca kilo kaybı, poliüre, polidipsi ve polifaji gibi semptomlar da gözlenir. Tip-1 diyabet hastalığının tedavi şekli olarak insülin uygulaması kullanılır. Bu uygulama insülin pompası ve insülin enjeksiyonu şeklinde olmak üzere iki tanedir. İnsülin tedavisi ile kan şekeri seviyesinde bir düzelme ve vücut ağırlığında da normale yakın bir değer gözlemlenmiştir (Atkinson ve ark., 2001).

Tip-1 diyabet, pankreastaki β -hücrelerinin yıkımı ya da yok olmaları sonucunda oluşan insülin seviyesinde azalma ve hiperglisemi ile karakterize edilir. Tip-1 diyabet teşhisi konulmuş hastalarda insülin tedavisi başlatılır (Atkinson ve ark., 2001; Chen ve ark., 2009). Chen ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada, rIGF-1 (sıçan insülin büyüme faktör-1) üretimi sonucunda, β -hücre fonksiyonunun sürdürülmesinin

sağlanması ile, apoptoz faktörlerinin etkisiyle β -hücrelerinin yıkımının önlenmesinin sağlandığını incelemişlerdir (Roith, 1997).

1.5.4. Diyabetik Kardiyomiyopatinin Genel Özellikleri

Kan şekerinin kontrolsüz ve kronik bir şekilde yükselmesi sonucu ortaya çıkan, yani diyabet nedeni, mortalitenin en önemli sebeplerinden birisi diyabetik kardiyomiyopattir. Özel bir tip kardiyomiyopati olan bu hastalık, insanlarda geç dönem komplikasyonu ile kendini gösterir. Deneysel metodlarla diyabet yapılmış sıçanlarda bu patolojinin temel olarak kalp hücrelerindeki mekanik, elektriksel, biyokimyasal ve morfolojik değişimlerden kaynaklandığı ve bunlarda aterosklerotik değişikliklerin rolünün olmadığı gösterilmiştir (Fein ve ark., 1980). Esas olarak kardiyomiyopati, kardiyak aritmi oluşmadan ortaya çıkan ventriküler fonksiyon bozukluğuyla kendini belli eder (Sethi ve ark., 1997). Bu bozukluklar, ventrikül kasılma kuvvetinde herhangi bir değişiklik olmaksızın, gevşeme-kasılma evresinde uzama ve böylece ventriküle yeteri kadar kanın dolamaması olarak tanımlanmaktadır. Deneysel yöntemle diyabet yapılmış sıçanlarda, bu bulgular, kalbe yüklenme (loading) sırasında daha da belirgin olmaktadır (Vizgirda ve ark., 2002).

Tip 1 diyabetik sıçanlarla yapılan deneylerde kalbin kronotropik ve inotropik özelliklerinde değişikliklerin olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir ve kalbin doğal atım hızında bir azalma meydana geldiği gösterilmiştir (Tomlinson ve ark., 1992). Bu değişiklik de kalbin elektriksel özelliklerine bağlıdır. Çünkü kalbin ventrikül ve atriyumundan kaydedilen aksiyon potansiyellerin sürelerinin kontrollere göre önemli derecede uzadığı bilinmektedir (Shimoni ve ark., 1994; Ayaz ve ark., 2004; Özdemir ve ark. 2005). AP' de oluşan bu uzamanın iyon akımlarıyla ilişkisi incelenmiştir. Ca^{2+} akımlarının değişmediği (Tsuchida ve ark., 1994) buna karşılık geçici dışarı doğru (transient outward, I_{to}) ve kararlı durumdaki (steady state, I_{sus}) pasif K^+ akımlarının azaldığı gösterilmiştir (Shimoni ve ark., 1994).

Ca^{2+} sinyal metabolizmasındaki değişiklikler kardiyomiyopati ve kalp yetmezliğinde çok önemli bir belirleyicidir (Morgan ve ark., 1990). Hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun ($[Ca^{2+}]_i$) düzenlenmesinde önemli olan yollardan; SR Ca^{2+} salınım kanalı, SERCA, PLB (SR membranında bulunan kanal proteini) defosforilasyonu ve hücreden dışarıya Ca^{2+} atılmasını sağlayan NCX' nun (Na/Ca^{2+} değiştokuşçusu) birçok diyabetik hayvansal modelde kardiyomiyopatinin oluşumunda azaldığı gösterilmiştir (Teshima ve ark., 2000; Choi ve ark., 2002; Norby ve ark., 2002).

SR, kalpte Ca^{2+} deposu olarak kullanılan önemli bir kaynaktır. Kalbin kasılma ve gevşeme fazlarında Ca^{2+} un depodan salınımından ve depo içine alımından sorumludur. SR proteinlerinin yaklaşık olarak % 75-90' nı SERCA proteinleri oluşturmaktadır (Carafoli E., 1987). SR içine Ca^{2+} alımı enerji bağımlı bir olaydır. Diyabetik kardiyomiyopati durumunda kalbin yavaş gevşemesi SR tarafından Ca^{2+} alımının yavaş olabileceği varsayılmıştır. Diyabetik durumda SR' ın daha az Ca^{2+} biriktirdiği de incelenmiştir (Penpargkul ve ark., 1981). Ayrıca, diyabetik kalpte SR' ın Ca^{2+} bağlamasının da baskılandığı araştırılmıştır (Ganguly ve ark., 1983, Lopaschuk ve ark., 1983).

Diyabetik kardiyomiyopati, erken dönemde diastolik ve geç dönemde sistolik fonksiyon bozukluğu ile karakterizedir. Diyabetik hastalarda sol ventrikülün sistolik fonksiyonu (özellikle hasta normotensif ise) diastolik fonksiyonuna oranla daha az etkilenmektedir ve araştırmalar diastolik fonksiyon bozukluğunun diyabetliler arasında 2 kat daha yaygın olduğunu göstermektedir (Raev, 1994).

Diyabetik kardiyomiyopatinin en tipik özelliği, sol ventrikül dolum anormalisidir ki bu durum sol ventrikül kompliansının azaldığını ya da gevşemenin uzadığını düşündürmektedir (Uusittupa ve ark., 1990). Diyabetik sıçan papiller kasında bazal düzeyde aksiyon potansiyeli süresi uzaması (Fein ve ark., 1980) yüksek düzeyde ise diyastolde kalbin dolumunu kısıtlayabilir (Shimoni ve ark., 1994).

Fein ve arkadaşları (1980), yaptıkları çalışmada STZ diyabetik sıçanlarda izole ventriküler papiller kasın performansındaki değişimleri incelemişler ve majör bulgu olarak, kasın kasılma hızının baskılandığı ve papiller kasın gevşeme hızının yavaşladığını kısaca in vitro olarak kardiyak performansın azaldığını bildirmişlerdir. Bu kardiyak değişimlerin hiperglisemi ile açıklanacak kadar basit olmadığı, bununla beraber diyabette kontraktıl proteinlerin enzimatik aktivitesinin azaldığı ortaya konmuştur (Fein ve ark., 1980).

Diyabette sarkolemmal NCX aktivitesinde de kusurlar meydana gelmektedir. Bunlar, diyabetik kalbin Ca^{2+} salma yeteneğini sınırladığı için hücre içi Ca^{2+} düzeyinin yükselmesine katkıda bulunmaktadır. NKA aktivitesindeki azalma, artan Na^+ miktarı ile bağlantılı ikincil olarak hücre içi Ca^{2+} tutulumunu artırmaktadır. Buna bağlı olarak Ca^{2+} kanalları aracılığıyla Ca^{2+} girişi uyarılmaktadır. Ayrıca kronik diyabet gelişim sürecinde kalpte SR ve sarkolemmal membranda yeniden yapılanma olduğuna dair de birçok veri bulunmaktadır ki bu olayın kardiyak bozukluklardaki rolünün dikkate değer olduğu düşünülmektedir (Dhalla ve ark., 1985).

Diyabetik kardiyomyopatiye beta adrenoreseptörlerde (β -AR) görülen değişimlerin önemi oldukça fazladır. Kardiyak β -AR sayısındaki azalma diyabetik kardiyomyopatinin nedenlerinden biri olarak düşünülmektedir. Ayrıca diyabette β -AR agonistlerine karşı kronotropik ve inotropik yanıtın azaldığı gösterilmiştir (Ramanadham ve Tenner, 1987; Karasu ve ark., 1990; Yu ve McNeill, 1991).

Kalp dokusunda hem β_1 hem de β_2 AR'ler bulunmaktadır (Brodde ve ark., 1984; Zerkovvski ve ark., 1986). İnsanda β_1 ve β_2 AR'ler G_s proteini aracılığıyla adenilat siklaza kenetlidir ve her iki reseptör de kontraktıl güç ve sinoatrial hızdaki artışlara aracılık etmektedir (Kaumann, 1997). Yeni çalışmalarda insan kalbinde bu iki reseptörden farklı olarak G_i proteinine kenetli ve kalpte kardiyodepresan etkilere aracılık eden p_3 -AR'lerinin olduğu kaydedilmiştir (Gauthier ve ark., 1996; Kaumann, 1997; Trochu ve ark., 1999). Bu reseptör aracılı etkiler yetmezlik olan hastalarda kardiyak disfonksiyona katkıda bulunmaktadır (Gauthier ve ark., 1996).

1.5.5. Diyabetik Kardiyomiyopatide Hücre İçi İyon Homeostazı: Na⁺

Deneysel diyabet modelinde, kalp elektriksel özelliklerindeki önemli değişikliklerden birisi kalp aksiyon potansiyeli süresinin uzamasıdır (Fein ve ark., 1983, Nobe ve ark., 1990). Değişiklikteki sebebin aksiyon potansiyelini oluşturan iyon akımlarından kaynaklandığı özellikle de geçici potasyum akımlarının yoğunluğunun ve genliğinin azalmasının etkili olduğu düşünülmüştür (Jourdan & Feuvray, 1993, Shimoni ve ark., 1994).

Chattou ve arkadaşları (2000) yaptıkları çalışmada, voltaj-kapılı Na⁺ kanal akımının (I_{Na}) STZ ile diyabet olmuş sıçan kalplerinde kontrole göre nasıl değiştiğini incelemişlerdir. I_{Na}, veratirin ve lizofosfotidilkolin (LPC) ile uyarılarak tüm hücre voltaj-kenetleme yöntemi ile ölçülmüştür. Amilorid türevi olan 3 farklı NHE inhibitörü kullanarak da I_{Na} ölçmüşlerdir. Sonuçta, diyabetik ventrikül hücrelerinde I_{Na}'nın kontrole göre daha küçük olduğunu ve NHE inhibitörleri kullanılarak ölçülen I_{Na}'nın inhibe olduğunu göstermişlerdir. Böylelikle, diyabet durumunda I_{Na}'nın küçük olmasını, diyabetik kardiyomiyopatinin bir sonucu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Sarkolemmadaki fosfolipid yerleşiminin diyabette değişmesi ve bu değişimin, hücre zarındaki iyon geçişlerini etkilediği düşüncesi ile desteklemişlerdir (Pierce ve ark., 1983).

NCX aktivitesinin baskılanması diyabetik kardiyomiyopatinin gelişmesinde yani sistolik ve diyastolik fonksiyonların bozulmasında önemli bir faktördür. Yapılan deneysel diyabet çalışmalarında, diyastolik bozuklukların sistolik bozukluklara neden olduğu gösterilmiştir (Raev ve ark., 1994). Diyabetik kalpte oluşan en önemli diyastolik bozukluğu, gevşeme fonksiyonunun bozulmasıdır (Raev ve ark., 1994). NCX ve SERCA kalbin gevşeme fonksiyonunda çok önemli rol oynarlar. Normal bir kalpte, Ca²⁺ un yaklaşık % 10-30 uzaklaştırılmasını sağlarken hastalıklı bir kalpte ise, NCX ve SR Ca²⁺ -pompa SERCA arasında bir ilişkinin sağlanması ile hücre içi Ca²⁺ dengesi oluşturulur (Bers ve ark., 1991). Schaffer ve arkadaşları (1997) yaptıkları çalışmada, deneysel olarak diyabet olmuş Wistar sıçanlardan elde edilen kalp hücre zarlarında NCX aktivitesinin düşük olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, NCX

aktivitesinin, yüksek glikoz ile inkübe edilmiş hücrelerde de azaldığı gösterilmiştir. Böylece, NCX aktivitesinin azalmasından yüksek kan şekerinin rolü olup olmadığı tam olarak açıklanamamıştır.

Chattou ve arkadaşları (1999) yaptıkları çalışmada, oluşturdukları deneysel diyabet modelinde sıçan kalp hücresindeki NCX akımının kontrole göre daha düşük olduğunu, ayrıca kafein uygulaması ile ölçülen NCX akımının da daha düşük olduğunu göstermişlerdir. Buna ek olarak, diyabet modelinde I_{Ca} da azaldığını göstermişlerdir. Dolayısıyla azalan I_{Ca} , NCX akımının azalmasına neden olduğu ve sarkoplazmik retikulumdan Ca^{2+} salınımlı inaktivasyonun diyabetik modelde yüksek olduğunu ileri sürmüşlerdir. Deneysel olarak oluşturulmuş diyabet modelinin NKA üzerindeki etkisi birçok organda özellikle de kalpte araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada NKA α_2 ve β izoformlarının ekspresyonunun azaldığı ama α_1 izoformunun ekspresyonunun ise arttığı gösterilmiştir (Gerbi ve ark., 1997).

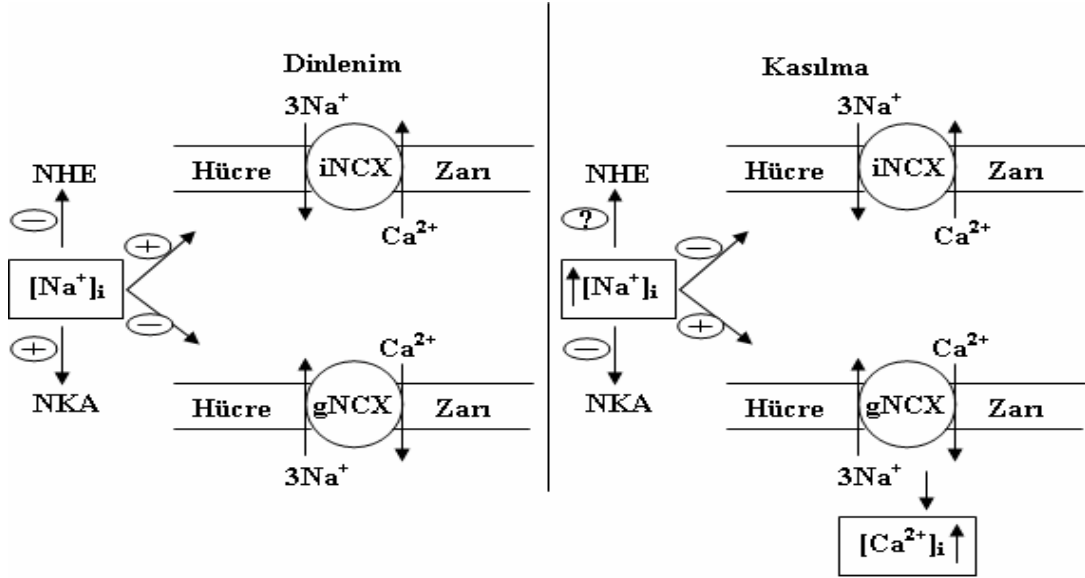
Pipet solusyonunda 80 mM Na^+ varken ölçülen NKA akımının diyabetik tavşan kalbinde (alloksan ile diyabet modeli) değişmediği, ancak 10 mM Na^+ varken ölçülen NKA akımının azaldığı gösterilmiştir (Hansen ve ark., 2007). Bu azalmanın hücre içi K^+ ya bağlı olduğu hücre dışı K^+ un ise bir etkiye sahip olmadığı da gösterilmiştir. Diyabetteki NKA akımındaki azalmanın ise anjiyotensin II blokörü (losartan) kullanıldığında normale döndüğü de gösterilmiştir (Hansen ve ark., 2007).

Alloksan aracılığıyla diyabet olmuş sıçan kalp ventrikül hücrelerinde de sakolemmal NCX, NKA ve Ca^{2+} pompa (PMCA) aktivitesi incelenmiştir (Golfman ve ark., 1998). Diyabet olduktan 2 hafta sonraki sıçanlardan izole edilen kardiyomiyositlerde NKA, NCX ve PMCA'nın aktivitelerinin azaldığı gösterilmiştir. Bu durumun ise, insülin tedavisi ile normale döndüğü araştırılmıştır. Ayrıca NKA mRNA seviyelerinin diyabetik durumda azaldığı, NCX mRNA seviyelerinin ise, arttığı gösterilmiştir. Sonuçta, sakolemmal NKA, NCX ve PMCA'daki bu değişikliklerin diyabet durumunda, hücre içinin aşırı Ca^{2+} ile yüklenmesinin bir sonucu olabileceği ileri sürülmüştür (Dhalla ve ark., 1982).

STZ uygulamalı diyabetin oluşturduğu hiperglisemik durumda, koroner hücrelerin olumsuz yönde etkilendikleri bilinmektedir (Baluchnejadmojarad ve ark., 2004; Cinar ve ark., 2001). Vial ve arkadaşları (2008) yaptıkları çalışmada, diyabetin etkisiyle kalp hızında (HR) bir artış olduğunu, EDD (endotel-bağımlı dilatasyon) ve EID (endotel-bağımsız dilatasyon) üzerinde ise, azaltıcı bir etkisinin olduğunu incelemişlerdir. Kariporid aracılı NHE1 inhibisyonunun ise, laktat/pirüvat oranını EDD durumunda düzelttiğini, EID ve HR üzerinde etkili olmadığını göstermişlerdir. Sonuçta, kariporid aracılı NHE1 inhibisyonunun hipergliseminin endotelli koroner hücrelerindeki toksik etkisini koruduğunu ileri sürmüşlerdir.

1.6. Çalışmanın Amacı

Literatür bilgileri, hücre içi Na^+ konsantrasyon değişiminin (homeostazi) ($[\text{Na}^+]_i$), hücrenin depolarize olması (voltaj kapılı Na^+ kanallarından hücre içine Na^+ girişi ile) ve aksiyon potansiyeli oluşumu yanında kalbin uyarılma-kasılma çiftleniminde önemli göreve sahip olan Ca^{2+} homeostazının düzenlenmesinde de çok önemli role sahip olduğunu göstermektedir. Örneğin, Chattou ve arkadaşları (1999) yaptıkları çalışmada, diyabet modelinde I_{Ca} 'nın azaldığını göstermişlerdir. Dolayısıyla azalan I_{Ca} , NCX akımının azalmasına neden olduğu ve sarkoplazmik retikulumdan Ca^{2+} salınımlı inaktivasyonun diyabetik modelde yüksek olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, diyabetik kardiyomyopati durumunda, NKA, NCX ve NHE fonksiyonlarının azaldığı bu bilgiye bağlı olarak da bazal $[\text{Na}^+]_i$ artışının gerçekleştiği ileri sürülmüştür (Hansen ve ark., 2007; Hattori ve ark., 2000; Golfman ve ark., 1998; Schaffer ve ark., 1997; Chattou ve ark., 1999; Vial ve ark., 2008). Literatürde uyarı verildiği durumda $[\text{Na}^+]_i$ 'un nasıl değiştiğine yönelik birkaç çalışma mevcuttur. Mills ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmada, hipertrofik durumdaki köpek kalp ventrikül hücrelerinde uyarı verildiği zaman $[\text{Na}^+]_i$ 'nin azaldığını incelemişlerdir. Şekil 1.11' de literatür bilgilerinin ışığında, dinlenim ve kasılma durumunda $[\text{Na}^+]_i$ 'un nasıl değiştiği özetlenmiştir.



Şekil 1.11. Dinlenme ve kasılma durumunda $[Na^+]_i$ düzenlenmesi. iNCX, ileri moddaki NCX, gNCX, geri moddaki NCX' i simgelemektedir. Şekil Mills ve arkadaşları (2007) tarafından hipertrofik bir kalp için yapılan model tarafımızdan diyabetik kalp için oluşturulmuş hipotetik bir modeldir.

Dinlenme ve uyarı altındaki durumlarda kardiyomiyositlerde $[Na^+]_i$ ' unun diyabetik kardiyomiyopatide nasıl olduğunu ve hangi etkilerle değiştiği ise, henüz detaylı olarak incelenmemiştir. Biz bu çalışmada, diyabetik sıçan kalplerinde, dinlenme durumundaki ve elektriksel uyarı altındaki kardiyomiyositlerde $[Na^+]_i$ ' un nasıl değiştiğini ve nelerden etkilendiğini araştırmayı amaçladık.

Bu amaçla çalışmamızda, diyabetik sıçan kalplerinden izole edilen papiller kas şeritlerinde aksiyon potansiyeli parametreleri ve özellikle AP depolarizasyon hızından birinci derecede sorumlu olan voltaj-kapılı Na^+ -kanal akımları (I_{Na}) nın (kalbin ventrikül bölgesinden izole edilmiş tek ventrikül hücrelerinde) incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın ikinci kısmında, yine kardiyomiyositlerde, hücre içi H^+ değişiminin incelenmesi hedeflenmiştir. Çalışmanın son bölümünde ise, bu parametrelerle ilişki olan NKA, NCX, ve NHE protein seviyelerinin diyabette nasıl değiştiğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Kullandığımız modelin tip 1 diyabet olduğunu doğrulamak amacıyla incelemelerimizin insülin ile tedavi edilmiş diyabetli sıçanlarda da tekrarlanması hedeflenmiştir. Çalışmanın AP ölçümleri hariç diğer tüm aşamaları kalpten taze olarak izole edilecek tek hücre seviyesinde kardiyomiyositlerde gerçekleştirilmesi planlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deney Gruplarının ve Diyabetin Oluşturulması

Deneyler için ağırlıkları 200-250g arasında olan, yaklaşık üç aylık, 60 tane Wistar türü sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar, deney süresi boyunca (beş hafta) kafes başına üç hayvandan fazla olmamak şartıyla ayrıldılar ve kısıtlama olmaksızın standart sıçan yemi ve su ile beslendiler.

DeneySEL yöntemle diyabet oluşturmak için Streptozotosin (STZ, Sigma) kullanıldı. Sitrat tamponu (pH 4,5 deki 0,1 M) içerisinde eritilen STZ, 50 mg/kg olacak şekilde tek doz halinde intraperitoneal (i.p.) bölgeye enjekte edildi (Öztürk ve ark., 1996). Enjeksiyondan bir hafta sonra MediSense Card Sensor ile hayvanların kan şekeri düzeyleri ölçülerek, diyabet olup olmadıklarına göre ayrıldılar. Kan şekerleri, 300 mg/dl ve bu değerin üstünde olan sıçanlar diyabetli (DM) olarak değerlendirilirken kan şekeri düzeyi bu değere ulaşmamış olan sıçanlar ise deneye alınmadılar. Diyabet grubunun yanı sıra, kontrol grubu için de 200-250 g arasındaki ağırlıklara sahip olan sıçanlar seçildi ve bu sıçanlar kontrol grubu olarak kullanıldı.

Diyabet ve kontrol grubundan başka insülin (5 IU/gün) ile enjekte ettiğimiz diyabetli grup da hazırlandı. İnsülin enjeksiyonuna sıçanların diyabet olmasından yaklaşık iki hafta sonra başlandı. Enjeksiyon iki hafta boyunca her gün olmak koşuluyla gerçekleştirildi. Bu şekilde hazırlanan bu sıçanlar deneylerde insülin ile tedavi edilmiş diyabetli grup olarak kullanıldı.

Sıçanların gruplara ayrılmasından sonraki beşinci hafta içinde, deneylere başlanmadan önce, sıçanların ağırlıkları, kan şekeri düzeyleri ve serum insülin seviyeleri ölçüldü. Serum insülin seviyeleri immüno serolojik yöntem ile ölçüldü (SPI-BIO). Serumda bulunan insülinin, asetilkolinesteraz bağlanmış insülin (işaretleyici) ile bağlanması sonucunda bağlı olan işaretleyici, bir spektrofotometre aracılığı ile 414 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

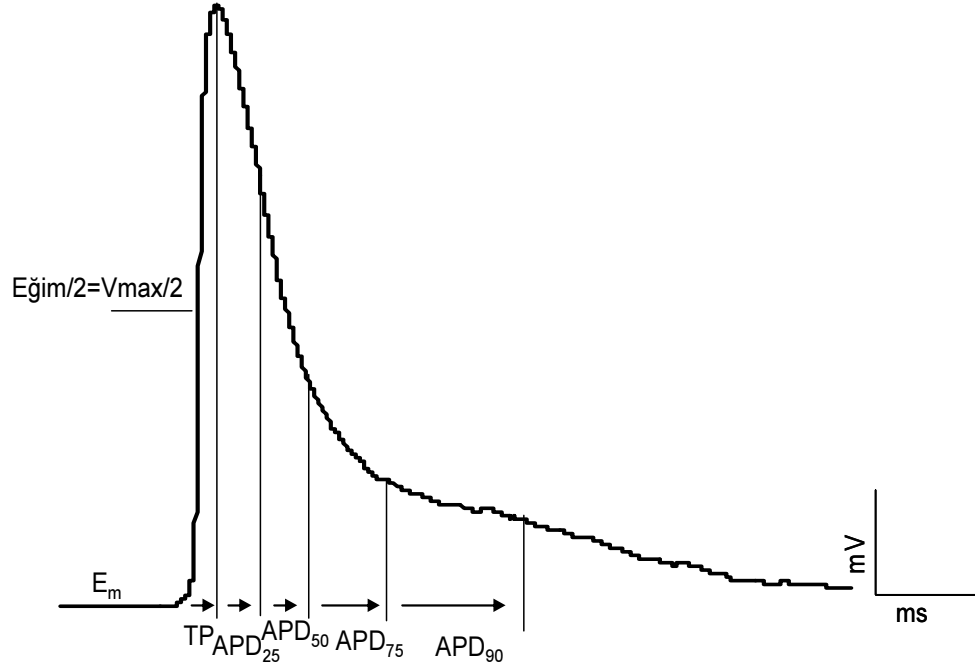
Deney süresi sonrası, sıçanlar heparinli sodyum pentaborbital ile (30 mg/kg) anestezi edildikten sonra göğüs kafesleri açılarak kalpleri hızlı bir şekilde çıkartıldı. Çalışmanın birinci bölümünde, kontrol ve diyabetli sıçanların, kalplerinden elde ettiğimiz papiller kastan mikroelektrot tekniği kullanarak hücre içi aksiyon potansiyeli ölçüldü. İkinci bölümünde, tüm grup sıçanların kalplerinden elde ettiğimiz izole hücrelerde (kardiyomiyosit) voltaj-kapılı Na^+ kanal akımı (I_{Na}), hücre içi Na^+ floresan şiddeti ve hücre içi pH ölçümleri yapıldı. Üçüncü bölümde ise, sıçanların kalp dokularından hücre zarı izole edilerek, NCX protein seviyesi, NKA protein seviyesi ve NHE protein seviyeleri biyokimyasal yöntemler kullanılarak ölçüldü. Sıçanların bakımı ve deneyler Ankara Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu' nun 27-128 numaralı kararı ile uygulanmıştır.

2.2. Aksiyon Potansiyelinin Kaydedilmesi

Sıçanlar heparinli sodyum pentaborbital ile (30 mg/kg) anestezi edildikten sonra kalpleri hızlı bir şekilde çıkarılarak önceden gazlanmış (%95 O_2 ve % 5 CO_2 ile), soğuk ve düşük Ca^{2+} içeren modifiye Krebs-Henseleit çözeltisi (mM: 119 NaCl, 4,8 KCl, 0,5 CaCl_2 , 1,2 MgSO_4 , 1,2 KH_2PO_4 , 20 NaHCO_3 , ve 10 Glikoz, pH 7,4) içine alındı. Aynı çözelti içerisinde kalbin sol ventrikül papiller kası çıkarılarak organ banyosu içine yerleştirildi. Papiller kas sürekli oksijen-karbondioksit karışımı (% 95 O_2 ve % 5 CO_2) ile gazlanan 1,8 mM CaCl_2 içeren Krebs-Henseleit çözeltisi ile organ banyosu içerisinde perfüze edildi. Papiller kasın bir ucu uyaran elektroduna diğer ucu ise kuvvet-uzunluk çevirecine bağlanarak 45 dakika boyunca dinlenmeye bırakıldı. Deney 37°C ' lik sabit banyo sıcaklığında gerçekleştirildi. Elektrot olarak 3 M KCl ile doldurulmuş, direnci 25-30 M Ω olan filamanlı borosilikat cam elektrotlar (Clark Elektromedical Instruments GC150F-15) kullanıldı. Elektrodun çıktısı bir ön yükselticiye oradan da BIOPAC MP35' e bağlanarak bir bilgisayara aktarıldı.

Aksiyon potansiyeli kayıtlarında, mikroelektrodun papiller kasın kasılan bölgesine bir manipülatör yardımı ile dik bir şekilde girişi gerçekleştirildi. Mikroelektrodun hücreye dokunduğu bilgisayardan hücre zarı potansiyelinin

yaklaşık olarak -80 mV' a gelmesi ile gözlemlendi. Papiller kasa uyarıcı elektrot ile uyarı verilmesiyle hücre zarında oluşan aksiyon potansiyelleri bilgisayara kayıt edildi.



Şekil 2.1. Sol ventrikül papiller kasta kaydedilen örnek aksiyon potansiyeli üzerinde ölçülen parametrelerin gösterilmesi. E_m : hücre zarı potansiyelini, $V_{max}/2$: aksiyon potansiyelinin depolarizasyon fazının eğiminin yarı değerini yani yarı maksimum hızını, TP: tepe değerine ulaşma süresini, APD_{25} , APD_{50} , APD_{75} ve APD_{90} : sırasıyla aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazının %25, %50, %75 ve %90'ına düşmesi için geçen süreleri göstermektedir (Özdemir, 2005).

Şekil 2.1.' de gösterildiği gibi bir hücreden kayıt ettiğimiz aksiyon potansiyelinin depolarizasyon fazının eğiminin yarı maksimum ($V_{max}/2$) değeri, repolarizasyon fazının % 25' ine, % 50' sine, % 75' ine ve % 90' ina düşüş süreleri (APD_{25} , APD_{50} , APD_{75} ve APD_{90}) Excel programında matematiksel hesaplamalar kullanılarak belirlendi.

Her bir deney hayvanının kalbinden elde edilen papiller kasa girilen her noktada en az 10 aksiyon potansiyeli kayıt edildi. Her bir papiller kasanın en az 3 veya 4 yerinden 10 kayıt alındı. Dolayısıyla, her bir papiller kas örneğinden ortalama 30-

40 aksiyon potansiyeli kayıt edilerek, bu aksiyon potansiyellerinden bir papiller kasın ortalama aksiyon potansiyeli parametreleri hesaplandı.

2.3. Kardiyomiyositlerin Elde Edilmesi

Kalp dokusundan kalp hücrelerinin (kardiyomiyosit) elde edilmesi enzimatik yöntemle yapıldı (Özdemir ve ark., 2005). Deney süresi sonrası, sıçanlar heparinli sodyum pentaborbital ile (30 mg/kg) anestezi edildikten sonra göğüs kafesleri açılarak kalpleri hızlı bir şekilde çıkartılıp, önceden gazlanmış (%95 O₂ ve % 5 CO₂ ile) ve pH sı 7.4 olarak ayarlanmış, Hepes çözeltisi (mM: 117 NaCl, 5,7 KCl, 4,4 NaHCO₃, 1,5 KH₂PO₄, 1,7 MgCl₂, 21 Hepes, 11,7 Glikoz, 20 Taurin) içine alındılar. Kalpler önce bu Ca²⁺ içermeyen çözelti ile 5 dakika perfüze edilerek tüm kan ve diğer sıvılardan temizlendiler. Daha sonra, kalpler 30–35 dakika süre ile içerisinde kollajenaz bulunan aynı çözelti (Worthington, type II) (1–1,2 mg/ml) ile perfüze edilerek kalbin kollejen dokusunun parçalanması sağlandı. Enzim ile perfüzyon sonrasında, kalbin atriyumları ve diğer dokuları tamamen çıkarılarak içinde Ca²⁺ içermeyen perfüzyon çözeltisi bulunan küçük bir kap içine alındı. Sonrasında kalp makasla küçük parçalara ayrılıp, ince bir filtreden geçirilerek hücreler bir tüpün içerisine alındı. Elde edilen hücreler aşamalı olarak artan farklı Ca²⁺ konsantrasyonları içeren çözeltiler ile muamele edildi ve son olarak ortamda 1 mM CaCl₂ olan çözelti içine alınıp, 37 °C' de 1 saat kadar inkübatörde bekletildi. Süre sonunda hücreler deneylerin gerçekleşeceği banyo solüsyonu içine alındılar.

2.4. Voltaj-Kapılı Na⁺ Kanal Akımı (I_{Na}) Ölçümü

Tüm-hücre voltaj kenetleme yöntemi kullanılarak voltaj-kapılı Na⁺ kanal akımları kaydedildi (Scamps ve ark., 1993). Akım kayıtları, izole edilen kalp ventrikül hücrelerinden Na⁺-HEPES solüsyonu içinde (içerik mM; NaCl 40, NMDG 127, CsCl 20, CaCl₂ 1,8, MgCl₂ 1,8, glikoz 10, HEPES 10, pH:7,4) ve 22 °C' de gerçekleştirildi. Kayıtlar 1,5-2,0 MΩ' luk elektrotlar kullanılarak ölçüldü. Kullanılan pipet solüsyonu ise;

CsCl 100, TEA 20, EGTA 10, HEPES 10, Na₂ATP 5, Na₂GTP 0,4; pH:7,3 (Alvarez ve ark., 2000). Kayıtlar bir bilgisayar tarafından 10 kHz filtreleme ile toplandı. Kenetleme holding potansiyeli -80 mV' ta tutularak, -130 mV' ta bir prepuls 150 ms uygulandı. Daha sonra depolarize edici pulslar -40 mV a veya -55 mV a kadar, 50 ms lik bir sürede uygulandı. Hücre tekrar -80 mV a repolarize edildi. Akım kayıtları Clampfit 8.0 programı ile analiz edildi. Akım genlik değeri, içeri doğru akımın tepe değeri ile 50 ms sonundaki akım arasındaki farkın hesaplanması ile elde edildi. Her potansiyel için elde edilen akım değeri ölçüm yapılan hücrenin ölçülen sığasına bölünerek değerlendirilip, tüm akım değerleri akım yoğunluğunun voltaja göre değişimi olarak gösterildi. Ayrıca Na⁺ kanal akımının -45 mV' daki akım yoğunlukları da hesaplandı. Deney sırasında, Na⁺ kanal akımı kaydı alınan her bir hücrenin hücre zarı kapasitans değerleri de kayıt edildi ve deney sonrasında toplam kayıt alınan her bir grup hücrenin ortalama hücre zarı kapasitans değerleri de hesaplandı.

2.5. Hücre İçi Sodyum ([Na⁺]_i) Floresan Şiddetinin Ölçümü

Bazal ve farklı uyarı frekanslarına karşılık [Na⁺]_i floresan şiddetinin ölçümü için RatioMaster mikro spektrofluorimetre ve FELIX programı kullanıldı.

2.5.1. Bazal [Na⁺]_i Floresan Şiddetinin Ölçümü

Hücre içi bazal sodyum değişimini ölçmek için bir ratiometrik boya olan SBFI (iki eksitasyon ratiometrik boya, 350 nm ve 380 nm dalga boyu) kullanıldı. İzole edilen hücreler 10 µM SBFI (Molecular Probes, Eugene, OR) ile 90 dk, 4 °C de bekletildi (Birkedal ve ark., 2007). Ölçüm sırasında kullanılan çözelti içeriği (mM): NaCl 137, MgCl₂ 1,7, CaCl₂ 1,8, KCl 5,4, glucose 10, HEPES 10'dur. İçinde banyo solüsyonu bulunan bir küvet içine alınan hücrelerden bir tanesine mikroskop ile odaklanarak, bu hücreden alınan [Na⁺]_i floresan şiddetleri bir bilgisayara kayıt edildi. Ölçüm sırasında gözlenen Na⁺ değişimine ait floresan sinyalleri PTI (photon technology international) RatioMaster mikro spektrofluorimetre ve FELIX programı kullanarak ölçüldü (Hammarström ve ark. 2002). Ayrıca hücrelerin dışında kalan bölgeden de

(background: arka alan) gelen floresan sinyalleri kayıt edildi. Deneyden sonra, ölçülen arka plandan gelen sinyaller hücreden ölçülen floresan sinyallerden çıkarılarak $((F_{350}-F_{350\text{Back}})/(F_{380}-F_{380\text{Back}}))$ gerçek $[Na^+]_i$ floresan şiddetleri hesaplandı. Bir deney hayvanından yaklaşık 8 farklı hücreden $[Na^+]_i$ floresan şiddetleri ölçüldü. Yaklaşık her bir gruba ait 8'er tane sıçandan elde edilen hücrelerde kayıt edilen tüm ölçümlerin ortalamaları alındı. Bu ortalama değerleri bar grafik olarak sunuldu.

2.5.2. Farklı Uyarı Frekanslarına Karşılık $[Na^+]_i$ Floresan Şiddetinin Ölçümü

Farklı uyarı frekanslarına karşı oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddetini ölçmek için bir nonratiometrik boya olan sodyum green (Na^+ Green) kullanıldı. Her bir gruba ait deney hayvanlarından izole edilen hücreler 5 μM Na^+ Green ile 60 dk, oda sıcaklığında, karanlıkta bekletilerek boya ile yüklenmeleri gerçekleştirildi (Sugishita ve ark., 2001). Deney sırasında kullanılan banyo çözeltisi şu şekildedir: (mM): NaCl 137, $MgCl_2$ 1,7, $CaCl_2$ 1,8, KCl 5,4, glucose 10, HEPES 10. Bir tarafında iki elektrodun bulunduğu ve içinde banyo çözeltisi bulunan bir küvet içine alınan hücrelerden uyarılabilir olanı seçilerek mikroskopta odaklandı ve pencere içine alındı. Hücreler 25-30 V' luk pulslar ile 0,2 Hz, 0,8 Hz, 1,0 Hz, 1,5 Hz ve 2,0 Hz' lik frekanslarda uyarılarak $[Na^+]_i$ floresan şiddetleri ölçüldü. Ölçülen $[Na^+]_i$ floresan şiddeti RatioMaster mikro spektrofluorimetre ve FELIX programı kullanılarak bilgisayara kaydedilip değerlendirildi.

2.6. Hücre İçi pH ($[H^+]_i$) Ve Sitoplazmik Asit Konsantrasyonun Zamanla Değişiminin Ölçümü

Hücre içi pH amonyum prepuls yöntemi kullanılarak konfokal mikroskobunda (Leica, Almanya) ölçüldü. Amonyum prepuls yöntemi ile hücrenin asidik duruma getirilmesi sonucunda asidik durumdan zamana bağlı olarak kurtulması hesaplandı.

2.6.1. $[H^+]_i$ 'nin Konfokal Mikroskop İle Ölçülmesi

Solüsyonlar cam rezarvuarlardan peristaltik pompa yardımı ile hücrenin bulunduğu banyo ortamına aktarıldı. Banyo ortamındaki solüsyonların derecesi $\sim 36^\circ C$ olarak korundu. 1 ml-lik *plexiglass* banyo ortamının altına bir lamel yerleştirildi ve ters mikroskobun tablasına tutturuldu (Leica, Almanya). Banyo ortamının tabanı hücre yapışmasını artırmak için poly-L-Lisin ile kaplandı. Süperfüzyon için HEPES tamponlu tirod çözeltisi (içerik mM; NaCl 135, KCl 4,5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, HEPES 20 ve glikoz 11) kullanıldı. Solüsyon pH'sı 10 mM NaOH ile $37^\circ C$ 'de 7,4 olacak şekilde ayarlandı. Amonyum (20 mM) HEPES tamponlu çözelti hazırlanırken ozmotik kompozisyon için NaCl amonyum ile yer değiştirildi. Sodyumsuz HEPES tamponlu tirod çözeltisi için NaCl ekimolar (iyon dengesini sağlayacak konsantrasyon) konsantrasyonda *N*-methyl-D-glukamin (NMDG) ile yer değiştirildi ve solüsyonun pH'sı HCl ile ayarlandı. Nigerisinli kalibrasyon solüsyonları (mM): KCl 140, MgCl₂ 1, EGTA 0,5 and nigerisin 0,01, 20 mM MES (pH 5,5) or 20 mM HEPES (pH 6,0-8,5) ile tamponlandı ve istenilen pH'ya 10 M NaOH ile $37^\circ C$ 'de ayarlandı. İzole sıçan ventriküler miyositlerinde pH_i ölçümü pH duyarlı boya karboksi SNARF-1 asetometil esteri (Invitrogen) ile yapıldı. Boya yüklemesi, pH_i ölçümü ve kalibrasyonu daha önceki çalışmalarda detaylı olarak bildirilmiştir (Buckler ve Vaughan-Jones, 1990). Hücrelerin konfokal görüntülenmesi için x20, 0,7 numerik apertürlü kuru objektifli lazer tarayıcı mikroskop kullanıldı. Karboksi-SNARF-1 floresansı 543 nm helium neon lazer yolu ile uyarılıp, 580 ve 640 nm de sürekli ölçüm yapılarak elde edildi. Veri toplama hızı 1.5 Hz idi. *Pinhole* 9,89 AU değerinde sabit tutuldu. Emisyon oranları pH_i değerine dönüştürülüp ifade edildi.

2.6.2. NHE Üzerinden Gerçekleşen Serbest Sitoplazmik Asit Konsantrasyon Değişikliklerinin Saptanması

NHE aracılı serbest sitoplazmik $[H^+]_i$ değişikliği 20 mM amonyum klorür ile 4-6 dk ön işlem sonrasında pH_i nin asidik bir değere ulaşması ve daha sonrasında pH_i 'nin pH'sı 7,4 olan HEPES tamponlu çözeltide asitten zamana bağlı olarak

kurtulmasından tahmin edilmiştir (Leem ve ark. 1999). dH_i/dt ($\mu\text{M}/\text{dk}$) hücre içi $[\text{H}^+]$ ' den kurtulma regresyon eğrilerine *fit* edilmesi en küçük kareler yöntemi ile gerçekleştirildi. Farklı pH değerlerindeki (0,05 pH aralığı ile) ölçülen ortalama dH_i/dt değerleri diyabetli ve kontrol hücrelerinde karşılaştırıldı. Ayrıca kontrol ve diyabetli hücrelerde hücre içi bazal pH değerleri de hesaplandı ve bar grafik şeklinde gösterildi.

2.7. Biyokimyasal Analizler

Protein seviyelerini belirlemek için deney gruplarına ait kalplerin öncelikle hücre zarları santrifüjleme işlemi ile hazırlandı. Elde edilen bu hücre zarlarından Western Blot tekniği ile proteinlerin seviyeleri ölçüldü.

2.7.1. Hücre Zarının Hazırlanması

Deney gruplarına ait kalplerin ventrikülleri alınarak, 3 x 20 s süre ile maksimum hızda ice-cold lizis tamponu (5 mmol/L Tris-HCl, pH 7,2, 5 mmol/L EDTA, 0,2 mmol/L phenylmethyl-sulphonylfloride (PMSF), 5mg/L aprotonin) içinde Ultraturax kullanılarak homojenize edildi. Elde edilen homojenat 400x g de 10 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatant 40.000x g'de 20 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pellet ise bir başka solüsyonda (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7,2, 5 mmol/L EGTA, 0,2 mmol/L PMSF, 5 mg/L aprotonin, 5 mmol/L MgCl, 2 mmol/L dithiothreitol) 40.000x g'de 20 dakika santrifüj edildi. Bu aşama bir başka solüsyon içinde (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7,2, 1 mmol/L EGTA, 0,2 mmol/L PMSF, 5 mg/L aprotonin, 10 mmol/L MgCl) tekrarlandı. Sonuçta proteinler 2 g/L olacak şekilde % 25 sükröz içeren aynı solüsyon içinde -80 °C' de muhafaza edildi.

2.7.2. NCX Protein Seviyesinin Ölçümü

Santrifüj işlemi ile elde edilen hücre zarı örnekleri %10 luk SDS-PAGE jel içerisine 20 μg protein olacak şekilde yüklenerek 150 V' da 1,5 saat yürütüldü. Proteinler 25

V' da 2 saat süreli transfer ile nitroselluloz membrana aktarıldı. Non-spesifik bağlanmaları önlemek amacıyla, membran TTBS/süt içerisinde 4 °C' de bir gece boyunca (blocking aşaması) bekletildikten sonra TTBS tamponu (% 20 Tween, 2 M Tris (pH 7.6), 154 mM NaCl) ile yıkanarak NCX antikoru (1/300, rabbit, Santa Cruz) ile oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Sonrasında membranlar 4 x 5 dakikalık TTBS ile yıkamanın ardından anti rabbit IgG-peroxidase (1/10,000) ile 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 4 x 5 dakikalık TTBS ile yıkamanın ardından lüminasans filme aktarıldı. Bilgisayara aktarılan film görüntüsü üzerinden lüminasans miktarı uygun bir program yardımıyla belirlendi. Aynı membranların striplenme işleminin (striplene işlemi: strip solusyonu: % 20 SDS, % 4 glisin pH 7.2 ile 2 defa 15' er dakika çalkalandıktan sonra 15 dakika TBS ile çalkalandı. Sonrasında 1 sn MetOH' da bekletilip, 5 dakika TBS ile yıkandı.) ardından blocking aşamasına geçildi. Sonrasında β -aktin antikoru (1/200, mouse, Santa Cruz) ile oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Sonrasında membranlar 4 x 5 dakikalık TTBS ile yıkamanın ardından anti mouse IgG-HRP (horse radish peroxidase) (1/1,000, Santa Cruz) ile 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 4 x 5 dakikalık TTBS ile yıkamanın ardından lüminasans filme aktarıldı. Bilgisayara aktarılan film görüntüsü üzerinden lüminasans miktarı uygun bir program yardımıyla belirlendi.

NCX için belirlenen protein miktarları, elektroforez sırasında hazırlanan jellere yüklenen protein miktarlarındaki olabilecek değişiklikleri önlemek amacıyla, β -aktin için belirlenen protein miktarlarına göre normalize edildi. Yaklaşık 6 deney hayvanının kalplerinden elde edilen hücre zarı proteinlerinin 4 tekrarı yapılarak ölçümler gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçların ortalamaları bar grafik olarak sunuldu.

2.7.3. NKA Protein Seviyesinin Ölçümü

NCX protein seviyesini ölçmek için kullandığımız elektroforez aşamasının ve nitroselluloz membrana transfer tekniğinin aynısı kullanıldı. Membrana aktarılan proteinlerdeki non-spesifik bağlanmaları önlemek amacıyla membran TTBS/süt

içerisinde 4 °C’ de bir gece boyunca bekletildikten sonra TTBS tamponu (% 20 Tween, 2 M Tris (pH 7.6), 154 mM NaCl) ile yıkanarak NKA antikoru (rabbit, Santa Cruz) ile oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Sonrasında membranlar 4 x 5 dakikalık TTBS ile yıkamanın ardından anti rabbit IgG-HRP (1/10,000) ile 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 4 x 5 dakikalık TTBS ile yıkamanın ardından lüminasans filme aktarıldı. Bilgisayara aktarılan film görüntüsü üzerinden lüminasans miktarları uygun bir program yardımıyla belirlendi. Aynı membranların striplenme işleminin (striplleme işlemi: strip solusyonu: % 20 SDS, %0 4 glisin pH 7.2 ile 2 defa 15’ er dakika çalkalandıktan sonra 15 dakika TBS ile çalkalandı. Sonrasında 1 sn MetOH’ da bekletilip, 5 dakika TBS ile yıkandı.) ardından blocking aşamasına geçildi. Sonrasında β -aktin antikoru (1/200, mouse, Santa Cruz) ile oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Sonrasında membranlar 4 x 5 dakikalık TTBS ile yıkamanın ardından anti mouse IgG-HRP (1/1,000, Santa Cruz) ile 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 4 x 5 dakikalık TTBS ile yıkamanın ardından lüminasans filme aktarıldı. Bilgisayara aktarılan film görüntüsü üzerinden lüminasans miktarı uygun bir program yardımıyla belirlendi.

NKA için belirlenen protein miktarları, elektroforez sırasında hazırlanan jellere yüklenen protein miktarlarındaki olabilecek değişiklikleri önlemek amacıyla β -aktin için belirlenen protein miktarlarına göre normalize edildi. Yaklaşık 6 deney hayvanının kalplerinden elde edilen hücre zarı proteinlerinin 4 tekrarı yapılarak ölçümler gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçların ortalamaları alınarak bar grafik olarak sunuldu.

2.7.4. NHE Protein Seviyesinin Ölçümü

NCX ve NKA protein seviyelerini ölçmek için kullandığımız elektroforez aşamasının ve nitroselluloz membrana transfer tekniğinin aynısı kullanıldı. Membrana aktarılan proteinlerdeki non-spesifik bağlanmaları önlemek amacıyla membran TTBS/süt içerisinde 4 °C’ de bir gece boyunca bekletildikten sonra TTBS tamponu (% 20 Tween, 2 M Tris (pH 7.6), 154 mM NaCl) ile yıkanarak NHE antikoru (1/200, rabbit,

Santa Cruz) ile oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Sonrasında membranlar 4 x 5 dakikalık TTBS ile yıkamanın ardından anti rabbit IgG-HRP (1/10,000) ile 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 4 x 5 dakikalık TTBS ile yıkamanın ardından lüminasans filme aktarıldı. Bilgisayara aktarılan film görüntüsü üzerinden lüminasans miktarları uygun bir program yardımıyla belirlendi. Aynı membranların striplenme işleminin (striplenme işlemi: strip solusyonu: % 20 SDS, %0 4 glisin pH 7.2 ile 2 defa 15' er dakika çalkalandıktan sonra 15 dakika TBS ile çalkalandı. Sonrasında 1 sn MetOH' da bekletilip, 5 dakika TBS ile yıkandı.) ardından blocking aşamasına geçildi. Sonrasında β -aktin antikoru (1/200, mouse, Santa Cruz) ile oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. Sonrasında membranlar 4 x 5 dakikalık TTBS ile yıkamanın ardından anti mouse IgG-HRP (1/1,000, Santa Cruz) ile 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 4 x 5 dakikalık TTBS ile yıkamanın ardından lüminasans filme aktarıldı. Bilgisayara aktarılan film görüntüsü üzerinden lüminasans miktarı uygun bir program yardımıyla belirlendi.

NHE için belirlenen protein miktarları, elektroforez sırasında hazırlanan jellere yüklenen protein miktarlarındaki olabilecek değişiklikleri önlemek amacıyla β -aktin için belirlenen protein miktarlarına göre normalize edildi. Yaklaşık 6 deney hayvanının kalplerinden elde edilen hücre zarı proteinlerinin 4 tekrarı yapılarak ölçümler gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçların ortalamaları alınarak bar grafik olarak sunuldu.

2.8. İstatistiksel Analizler

Tüm deney sonuçları ortalama \pm SEM olarak verildi. Tüm parametreler student-t-test ve one-way ANOVA testi kullanılarak karşılaştırıldı. One-way ANOVA testi sonrasında farklı olan grupları belirlemek amacıyla TUKEY post-hoc testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık test değeri olarak 0.05 değeri seçildi.

2.9. Kullanılan Kimyasallar

NaCl, glikoz, CaCl₂, HEPES, SDS, CsCl₂, taurin, MgCl₂, aprotonin, PMSF Sigma (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany)' dan, KCl, MgSO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃ ise Merk (Darmstadt, Germany)' den Tris-HCl AppliChem' den, kollajenaz Worthington' dan (Lakewood, NJ), SBF1 ve sodyum green Invitrogen (Molecular Probes)' den satın alınmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Hayvanların Genel Özellikleri

Deneylede yaşları 3 aylık olan yetişkin Wistar türü erkek sıçanlar kullanılmıştır. Kullanılan sıçanların genel özellikleri Tablo 3.1' de gösterilmiştir. Deney başlangıcında deneye alınan tüm sıçanların gruplara göre (sırasıyla kontrol, diyabet ve insülin tedavili diyabet grupları) ortalama (\pm SEM) vücut ağırlıkları ($206,0 \pm 4,3$ g, $205,7 \pm 3,7$ g ve $206,1 \pm 4,1$ g) ve kan şekeri değerleri ($99,2 \pm 2,2$ mg/dL, $99,6 \pm 2,2$ mg/dL ve $100,5 \pm 2,9$ mg/dL) olarak seçilmiştir. Streptozotosin (STZ) uygulaması sıçanların kan şekerinde 48 saat içinde yaklaşık 4-5 katlık artışlara neden olmuş ve bu artışın stabil durumu gelmesi beklenerek birinci hafta sonunda kan şekerleri değişmeyen sıçanlar diyabetli grup olarak kabul edilmiştir. STZ uygulamasının beşinci haftasında bu grup sıçanların kan şekeri ve serum insülin değerleri Tablo 3.1' de görüldüğü gibi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde farklı bulunmuştur. Bu grup sıçanların beşinci hafta sonundaki vücut ağırlıkları kontrol grubuna göre önemli derecede düşük bulunmuştur (Tablo 3.1).

Diyabetli sıçanların bir grubuna diyabet tespitinden iki hafta sonra her gün olmak üzere insülin tedavisi uygulanmıştır. Bu grup diyabetli sıçanların kan şekeri değerlerinde diyabetli gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşme ve serum insülin seviyesinde ise yükselme gözlenmiştir. Bu grubun vücut ağırlıklarının ise, diyabet grubuna göre artmış ve kontrol grubu vücut ağırlığı değerine yaklaştığı gözlenmiştir (Tablo 3.1).

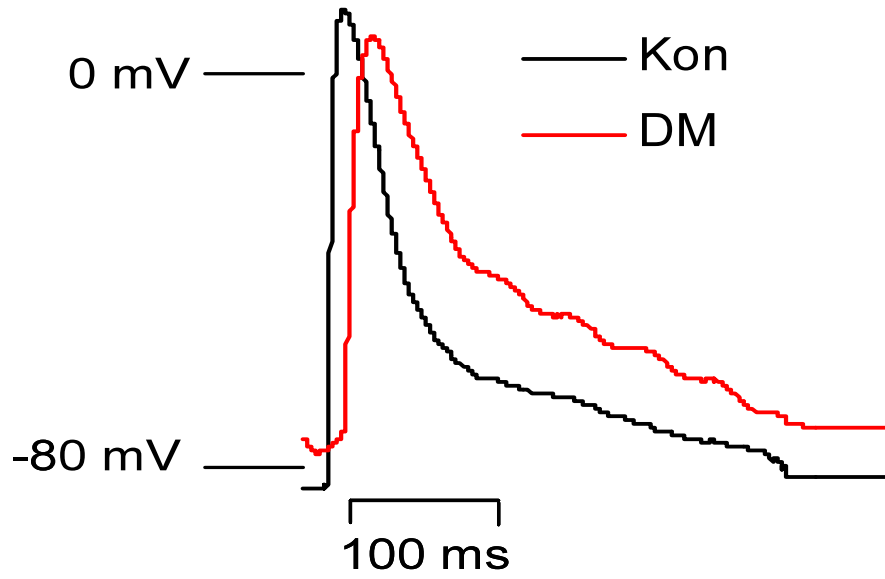
Tablo 3.1: Hayvanların vücut ağırlığı, kan şekeri ve serum insülin değerleri.

	Vücut Ağırlığı (g)	Kan Şekeri (mg/dl)	Serum İnsülin Seviyeleri (ng/mL)
Kon (n=23)	219,2 ± 4,4	102,8 ± 1,8	2,07 ± 0,64
DM (n=20)	156,7 ± 4,4*	498,1 ± 14,9*	0,07 ± 0,04*
DM+İns (n=15)	189,1 ± 4,8 [†]	182,5 ± 17,0* [†]	2,06 ± 0,32 [†]

Kısaltmalar kontrol (Kon), diyabet (DM) ve insülin ile tedavi edilmiş diyabet (DM+İns) olarak kullanılmıştır. Grupların deney sürecinin sonunda (STZ enjeksiyonunu takiben 5. ci hafta) ölçülen vücut ağırlıkları (g) kan şekeri düzeyleri (mg/dl) ve serum insülin seviyeleri verilmiştir. Değerler ortalama±SEM olarak verilmiştir. n= hayvan sayısı, *p<0,05 vs. kon, [†]p<0,05 vs. DM.

3.2. Diyabetin Aksiyon Potansiyeli Parametrelerine Etkisi

Kalp kasının kasılma sürecinin aksiyon potansiyelinin oluşması ve yayılması süreçleri ile birlikte gerçekleştiği bilinmektedir. Papiller kası ince demetlerinde mikroelektrot kullanılarak ölçülen hücre içi aksiyon potansiyeli parametreleri Tablo 3.2’de verilmiştir. Kontrol ve diyabetli gruplara ilişkin birer aksiyon potansiyeli kayıtları örnek olarak Şekil 3.1.’de gösterilmiştir. Tablo 3.2’den görüldüğü gibi, diyabetli grupta ölçülen dinlenme zar potansiyelinin kontrol grubuna göre depolarize durumda bulunduğu, aksiyon potansiyelinin tepe değerinin ise diyabetlilerde kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, diyabet grubuna ait aksiyon potansiyelinin tepe değerine ulaşma süresinin (TP), kontrol grubuna ait aksiyon potansiyeli TP değerine göre daha uzun süreli olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.1: Kalbin sol ventrikülünde bulunan papiller kasından kayıt edilen örnek aksiyon potansiyeli eğrileri. Kon: Kontrol grubu, DM: Diyabetli grubunu simgelemektedir.

Aksiyon potansiyelinin depolarizasyon deseninin (uzaysal ve zamansal) diyabetli kalp kasında kontrol grubuna göre daha polarize, daha kısa ve daha yavaş olması yanında, Excel’ de nümerik bir matematiksel işlem $[(y_2 - y_1) / (x_2 - x_1)]$ ile hesaplanan depolarizasyon fazının yarı maksimumdaki değişim hızı değerinin de daha yavaş olduğu görülmüştür. Deneysel gruplara ait hücre zarı dinlenme potansiyeli, aksiyon potansiyelinin depolarizasyon fazının yarı maksimum değeri ($V_{max/2}$), tepe değeri ve bu tepe değerine ulaşma süresi Tablo 3.2.’ de verilmiştir.

Tablo 3.2: Aksiyon potansiyeli ile ilgili parametreler.

	Zar Potansiyeli (mV)	Tepe Değeri (mV)	TP (ms)	Vmax/2 (V/s)
Kon (n=10)	82,3 ± 0,8	8,4 ± 1,2	26,9 ± 0,7	53,8 ± 1,9
DM (n=10)	77,3 ± 0,9*	4,1 ± 0,5*	31,2 ± 1,5*	28,8 ± 0,8*

Kısaltmalar kontrol (Kon), diyabet (DM) olarak kullanılmıştır. Vmax/2: aksiyon potansiyeli depolarizasyon fazının yarı maksimum değeri. TP: aksiyon potansiyelinin tepe değerine çıkış süresi. n= hayvan sayısı, *p<0,05 vs. Kon.

Aksiyon potansiyelinin depolarizasyon deseninin (uzaysal ve zamansal) diyabetli kalp kasında kontrol grubuna göre daha polarize, daha kısa ve daha yavaş olması yanında, Excel’ de nümerik bir matematiksel işlem $[(y_2-y_1)/(x_2-x_1)]$ ile hesaplanan depolarizasyon fazının yarı maksimumdaki değişim hızı değerinin de daha yavaş olduğu görülmüştür. Deneysel gruplara ait hücre zarı dinlenme potansiyeli, aksiyon potansiyelinin depolarizasyon fazının yarı maksimum değeri ($V_{max/2}$), tepe değeri ve bu tepe değerine ulaşma süresi Tablo 3.2.’ de verilmiştir.

Aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazları olarak % 25, % 50, % 75 ve % 90 değerleri hesaplanmıştır. Tüm deneysel gruplarda aksiyon potansiyeli kayıdı aldıktan sonra hesapladığımız repolarizasyon fazının % 25, % 50, % 75 ve % 90 değerleri Tablo 3.3.’ de gösterilmiştir.

Tablo 3.3: Aksiyon potansiyeli repolarizasyon fazı parametreleri.

	APD ₂₅ (ms)	APD ₅₀ (ms)	APD ₇₅ (ms)	APD ₉₀ (ms)
Kon (n=10)	12,1 ± 1,0	22,9 ± 2,0	41,9 ± 3,7	73,0 ± 4,9
DM (n=10)	21,4 ± 2,5*	40,0 ± 4,5*	71,7 ± 7,6*	108,0 ± 6,2*

Kısaltmalar kontrol (Kon), diyabet (DM) olarak kullanılmıştır. APD₂₅, aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazının % 25' ine inme süresini, APD₅₀: aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazının % 50' sine inme süresini, APD₇₅, aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazının % 75' ine inme süresini, APD₉₀, aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazının % 90' ına inme süresini göstermektedir. n= hayvan sayısı, *p<0,05 vs. Kon.

Tablo 3.3.' de gösterildiği gibi aksiyon potansiyeli repolarizasyon fazının % 25' ine inme süresinin diyabetli gruba ait ölçümlerde kontrol grubuna ait ölçüm sonuçlarına göre daha uzun süreli yani daha yavaş olduğu gösterilmiştir. Aksiyon potansiyelinin % 50' sine inme süresinin diyabetli gruba ait aksiyon potansiyeli sonuçlarında kontrol grubuna göre daha uzun süreli olduğu gösterilmiştir. Aksiyon potansiyelinin % 75' ine inme süresinin diyabetli gruba ait aksiyon potansiyeli sonuçlarında kontrol grubuna göre daha uzun süreli olduğu gösterilmiştir. Aksiyon potansiyelinin % 90' nına inme süresinin ise diyabetli gruba ait aksiyon potansiyeli sonuçlarında kontrol grubuna göre daha uzun süreli olduğu gösterilmiştir.

3.3. Deneysel Diyabetin ve İnsülin Tedavisinin Voltaj-kapılı Na⁺ Kanalları Üzerine Etkisi

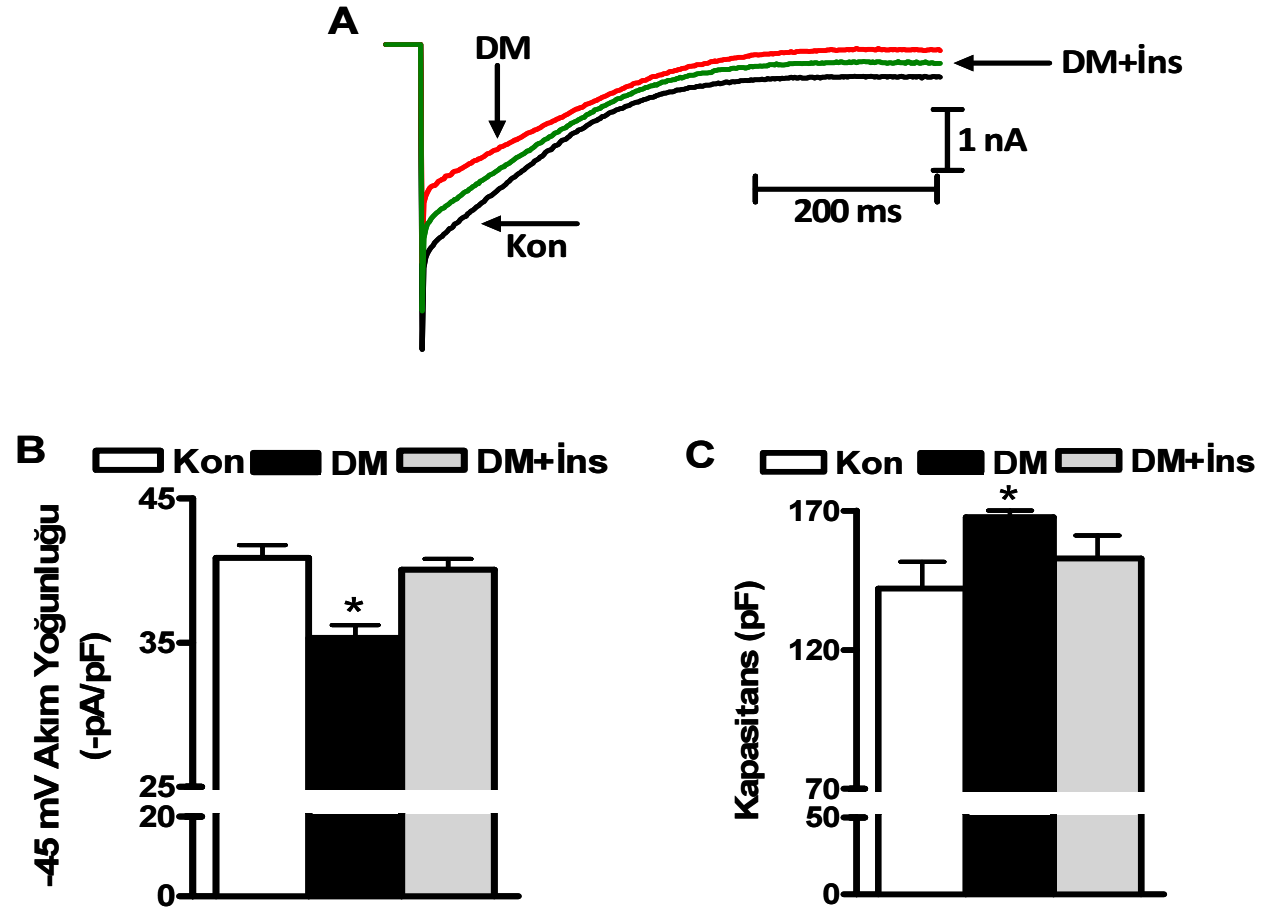
Diyabetli grubun aksiyon potansiyelinin depolarizasyon fazının yarı maksimum değerinin kontrole göre daha düşük olması, deneysel diyabetin voltaj-kapılı Na⁺ kanalları üzerinde bir etkisinin olup olmadığını incelememize neden olmuştur. Bunun için deneysel gruplardan elde ettiğimiz kardiyomiyositlerde voltaj-kapılı Na⁺

kanal akımları voltaj-klamp tekniğini tüm-hücre modunda kullanarak ölçülmüştür. Ayrıca, bu kanal akımlarının akım-voltaj karakteristiği, aktivasyon ve inaktivasyon parametreleri hesaplanmıştır.

3.3.1. Voltaj-kapılı Na⁺ Kanal Akımı İle İlgili Parametreler

Aksiyon potansiyelinin depolarizasyon fazında görevli olan ve tüm hücre voltaj kenetleme yöntemi kullanılarak ölçtüğümüz Na⁺ kanal akımı örnek eğrisi Şekil 3.2.' de gösterilmiştir. Voltaj-kapılı Na⁺ kanal akımları örneğinden de görüldüğü gibi diyabetli gruba ait kardiyomiyositlerde -45 mV' da ölçülen akım genliğinin maksimum değerde olduğu ve bu değer kontrol grubuna ait kardiyomiyositlere göre daha küçük olduğu görülmüştür.

Ayrıca Şekil 3.2.' de deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde ölçülen voltaj-kapılı Na⁺ kanal akımının akım yoğunluğunun maksimum olduğu, -45 mV' daki akım yoğunluğu ve hücre zarı kapasitans ortalama değerleri de gösterilmiştir. Akım yoğunluğu değerlerinin diyabetli grupta kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gösterilmiştir. Diyabetli gruba ait kardiyomiyositlerin hücre zarı kapasitans değerleri kontrol kardiyomiyositlerine göre daha yüksek ölçülmüştür. Dolayısıyla diyabetli gruba ait kardiyomiyositlerin kontrol kardiyomiyositlerine göre daha büyük olduğu söylenilebilir. İnsülin ile tedavi edilmiş diyabetli gruba ait kardiyomiyositlerin hücre zarı kapasitans değerlerinin ve akım yoğunluklarının kontrol grubu kardiyomiyositlerine benzediği gösterilmiştir.



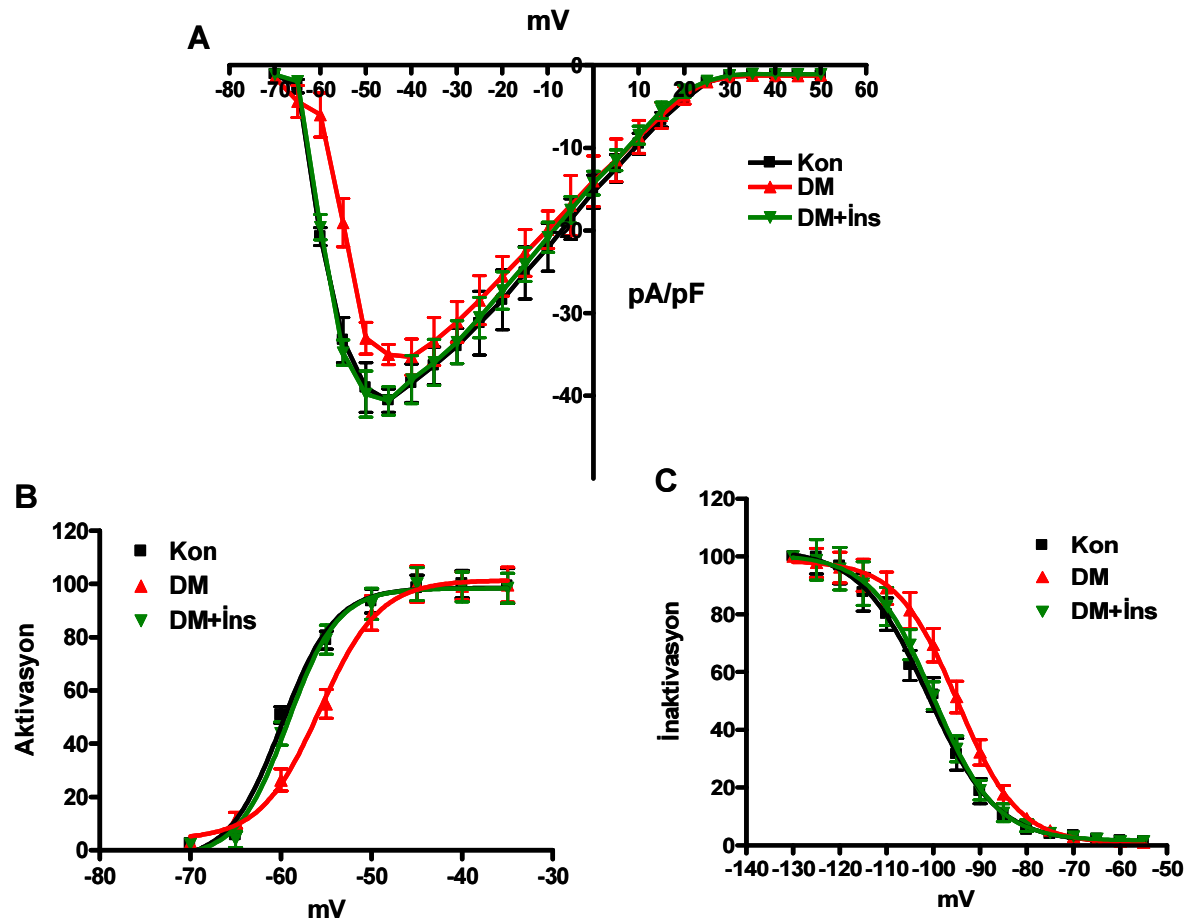
Şekil 3.2: Deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde ölçülen Na⁺ kanal akımı ile ilgili parametreler. (A): Na⁺ kanal akımı örnek eğrisi, (B): -45 mV' daki akım yoğunluğu, (C): hücre zarı kapasitans ortalama değerlerinin gösterimi. Kon: Kontrol grubu, DM: Diyabetli grubu, DM+İns: İnsülin enjekte edilmiş diyabetli grubu göstermektedir. *p<0.05 vs. kon.

3.3.2. Voltaj-kapılı Na⁺ Kanallarının Aktivasyonu ve İnaktivasyonu İle İlgili Parametreler

Tüm hücre voltaj kenetleme tekniği ile tüm deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde ölçülen voltaj-kapılı Na⁺ kanal akımının akım-voltaj karakteristiği Şekil 3.3. A' da gösterilmiştir voltaj-kapılı Na⁺ kanal akımı ölçümü sırasında uyguladığımız akım protokolüne bağlı olarak voltaj-kapılı Na⁺ kanallarının aktivasyonu ve inaktivasyonu da ölçülmüştür. Şekil 3.3. B ve C' de sırasıyla voltaj-kapılı Na⁺ kanallarının aktivasyon ve inaktivasyon eğrileri gösterilmiştir.

Her bir hücreye ait akım değerleri o hücrenin hücre zarı kapasitans değerine bölünerek (pA/pF olarak) hesaplanmıştır. Şekil 3.3. A' da gösterildiği gibi diyabetli gruba ait kardiyomiyositlerde ölçülen voltaj-kapılı Na⁺ kanal akımının akım yoğunluğunun kontrol grubuna göre daha küçük olduğu gözlemlenmiştir.

Şekil 3.3. B' de gösterildiği gibi diyabetli gruba ait kardiyomiyositlerde ölçülen voltaj-kapılı Na⁺ kanallarının aktivasyonunun kontrol grubu kardiyomiyositlerine göre daha pozitif değerlere doğru (sağa) kaymıştır. Şekil 3.3. C' de ise, diyabetli gruba ait kardiyomiyositlerde voltaj-kapılı Na⁺ kanallarının inaktivasyonu eğrisinin sağa doğru yani daha pozitif değerlere doğru kaydığı gösterilmiştir.



Şekil 3.3: Deneysel gruplara ait kardiyomyositlerde ölçülen voltaj-kapılı Na⁺ kanallarının akım, aktivasyon ve inaktivasyon ile ilgili parametreleri. (A): Voltaj-kapılı Na⁺ kanallarının akım-voltaj karakteristiği, (B): Voltaj-kapılı Na⁺ kanallarının aktivasyon eğrisi, (C): Voltaj-kapılı Na⁺ kanallarının inaktivasyon eğrisi gösterilmektedir. Kon: Kontrol, DM: Diyabet, DM+İns: İnsülin ile tedavi edilmiş diyabetli grubu simgelemektedir.

Tüm deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde ölçtüğümüz voltaj-kapılı Na⁺ kanallarının aktivasyon ve inaktivasyon değerleri Tablo 3.4.' de gösterilmiştir.

Tablo 3.4: Na⁺ kanal akımı aktivasyon ve inaktivasyon parametreleri.

	Kon	DM	DM+İns
Aktivasyon			
V _{1/2} , (mV)	-59,89 ± 0,63	-55,70 ± 0,42*	-59,25 ± 0,46
İnaktivasyon			
V _{1/2} , (mV)	-101,10 ± 0,05	-94,74 ± 0,06*	-100,07 ± 0,04

Kısaltmalar kontrol (Kon), diyabet (DM) ve insülin ile tedavi edilmiş diyabet (DM+İns) olarak kullanılmıştır. *p<0,05 vs. Kon.

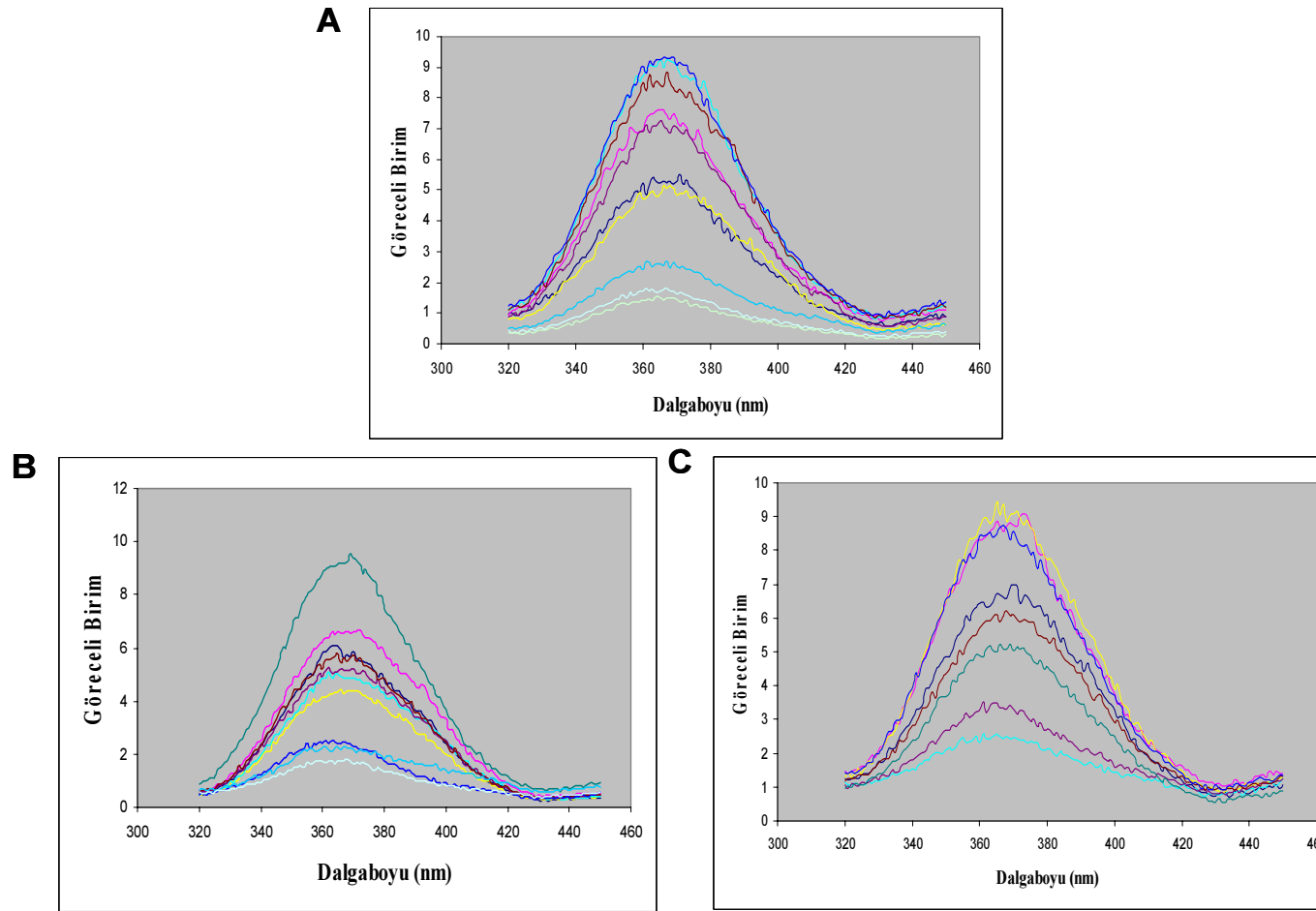
3.4. Deneysel Diyabetin ve İnsülin Tedavisinin [Na⁺]_i Floresan Şiddeti Üzerine Etkisi

Deneysel diyabetin bazal [Na⁺]_i floresan şiddeti ve farklı uyarı frekanslarına karşılık [Na⁺]_i floresan şiddeti üzerine nasıl bir etkisi olduğu incelenmiştir. Ayrıca, diyabetin [Na⁺]_i floresan şiddetine olan etkisinin insülin tedavisi ile nasıl değiştiği de incelenmiştir.

3.4.1 Bazal [Na⁺]_i Floresan Şiddeti İle İlgili Parametreler

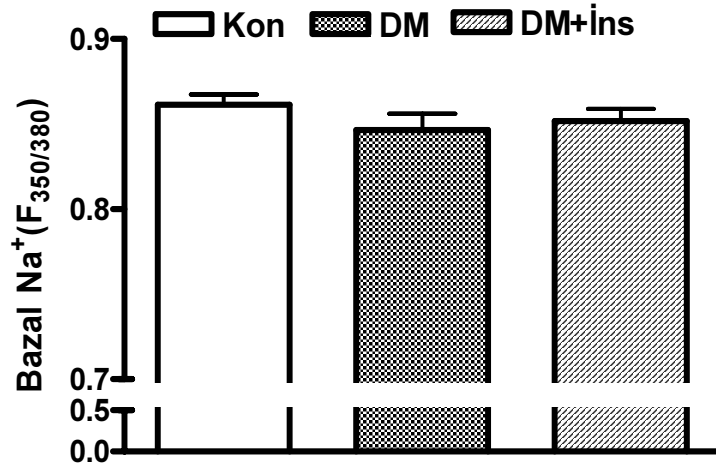
Bazal [Na⁺]_i floresan şiddeti ölçümü öncesinde kardiyomiyositlerin SBFI ratiometrik boya ile yüklü olup olmadıkları kontrol edilmiştir. Bunun için öncelikle her bir gruba ait SBFI boyası ile yüklü olmayan kardiyomiyositlerin, (boş hücre) eksitasyon spektrumu daha sonra SBFI boyası ile yüklü olan kardiyomiyositlerin eksitasyon

spektrumları ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerin boş kardiyomiyositlere oranla SBFI boyası ile yaklaşık 2-7 katlık farkla yüklendikleri gözlemlenmiştir. Şekil 3.4. A' da kontrol grubuna ait kardiyomiyositlerde yüklenme durumları, B' de diyabetli gruba ait kardiyomiyositlerin SBFI boyası ile yüklü olup olmadıkları C' de insülin ile tedavi edilmiş diyabetli gruba ait kardiyomiyositlerin SBFI boyası ile yüklü olup olmadıkları gösterilmiştir. Şekillerde altta kalan 2-3 eksitasyon spektrumu SBFI ile yüklü olmayan kardiyomiyositlere ait iken, üstte kalan tüm eksitasyon spektrumları SBFI ile yüklü kardiyomiyositlere aittir. Kontrol grubuna ait kardiyomiyositler yaklaşık 2-7 katlık bir artış ile SBFI boyası ile yüklenmişlerdir. Diyabet grubuna ait kardiyomiyositler yaklaşık 2-6 katlık bir artış ile SBFI boyası ile yüklenmişlerdir. İnsülin ile tedavi edilmiş diyabet grubuna ait kardiyomiyositler ise, yaklaşık 2-5 katlık bir artış ile SBFI boyası ile yüklenmişlerdir. Dolayısıyla tüm deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerin SBFI boyası ile yüklü olanlar ile bazal $[Na^+]_i$ ölçülmüştür.



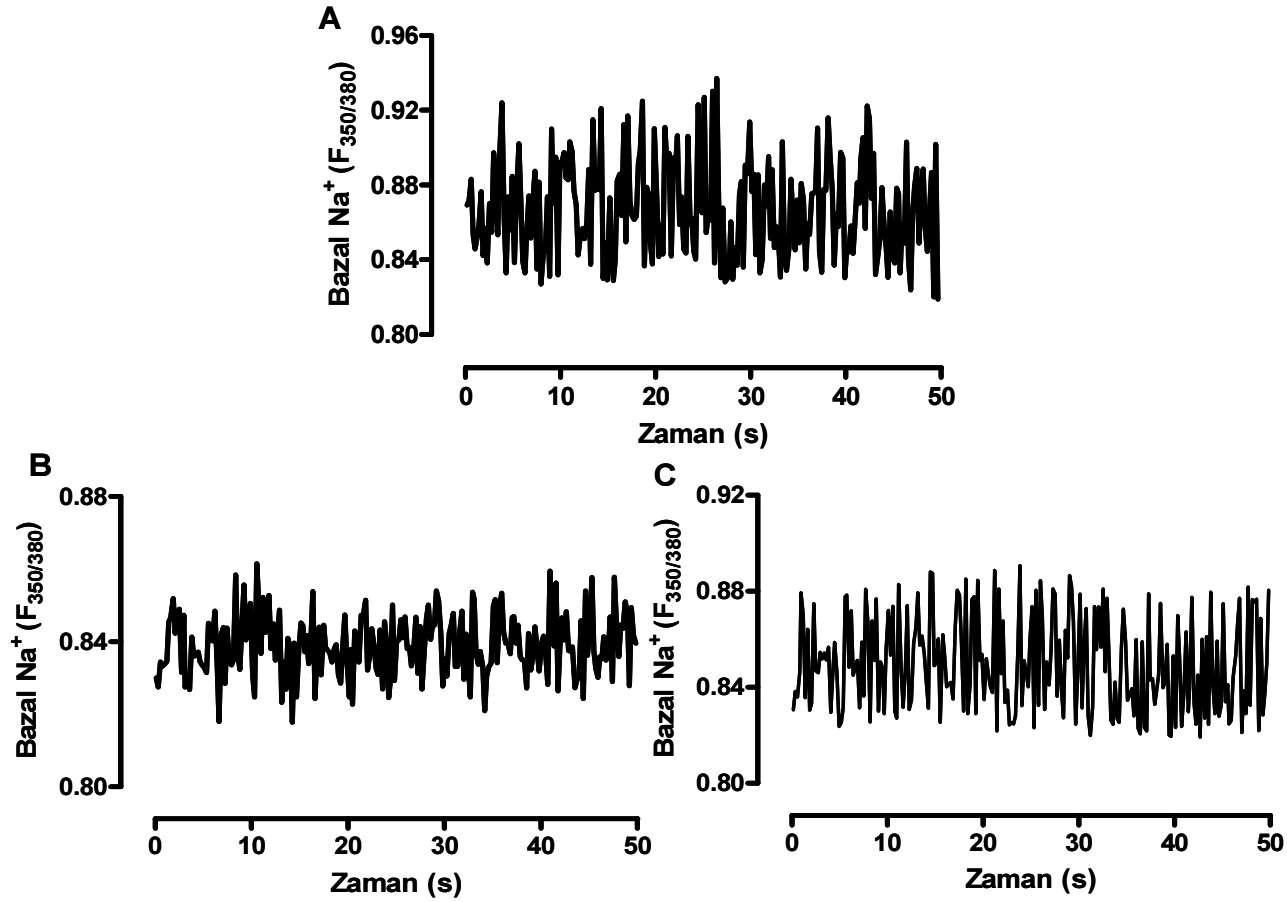
Şekil 3.4: Tüm deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde SBFI ile yüklenme durumunun gösterimi. (A) Kontrol, (B) Diyabet ve (C) insülin enjekte edilmiş diyabet grubunu göstermektedir. En altta kalan 2-3 eğri SBFI ile yüklü olmayan kardiyomiyositlerin, üstte kalan eğriler ise SBFI ile yüklü olan kardiyomiyositlerin eksitasyon spektrumlarını göstermektedir.

Bazal $[Na^+]_i$ floresan şiddeti ölçümü öncesinde deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerin SBFI boyası ile yüklü olup olmadıklarını kontrol ettikten sonra, her bir gruba ait SBFI boyası ile yüklenmiş kardiyomiyositlerde bazal $[Na^+]_i$ floresan şiddeti ölçülmüştür. Kontrol, diyabet ve insülin ile tedavi edilmiş diyabetli gruba ait kardiyomiyositlerde ölçülen bazal $[Na^+]_i$ floresan şiddeti ortalama değerleri Şekil 3.5.' de gösterilmiştir.



Şekil 3.5: Kardiyomiyositlerde ölçülen bazal $[Na^+]_i$ floresan şiddetinin ortalama değerlerinin gruplara göre dağılımı. Kon: Kontrol, DM: diyabet ve DM+Ins: insülin ile tedavi edilmiş diyabetli grubu simgelemektedir. Değerler ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

Şekil 3.5.' de gösterildiği gibi kontrol, diyabetli ve insülin ile tedavi edilmiş diyabetli gruplardan izole edilen kardiyomiyositlerde, ölçülen bazal $[Na^+]_i$ floresan şiddetinin gruplar arasında istatistiksel olarak bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 3.6: Tüm deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde bazal $[Na^+]_i$ floresan şiddeti gösterimi. SBF1 boyası ile yüklenmiş olan kontrol (A), diyabet (B) ve insülin ile tedavi edilmiş diyabet (C) gruplarına ait kardiyomiyositlerde ölçülen örnek bazal $[Na^+]_i$ floresan şiddeti eğrisi.

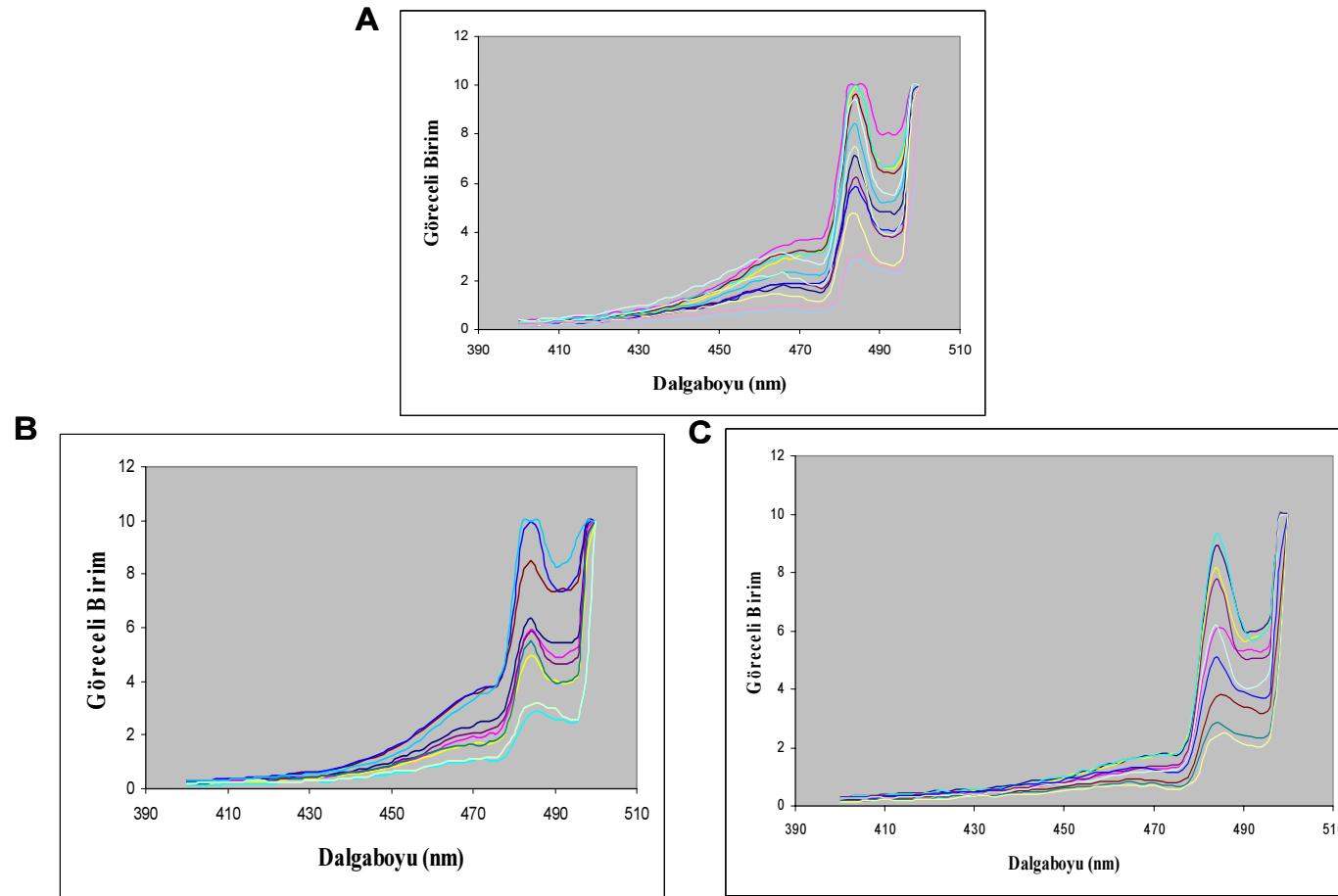
3.4.2. Farklı Uyarı Frekanslarına Bağlı Bazal $[Na^+]_i$ Floresan Şiddetinin Değişim Deseni

Tüm hücre voltaj kenetleme tekniği ile ölçtüğümüz voltaj-kapılı Na^+ kanal akımının maksimum değerinin (akım yoğunluğu olarak) diyabet grubuna ait kardiyomiyositlerde kontrol grubuna göre daha küçük olmasından yola çıkarak, uyarı verildiği durumda kardiyomiyositlerdeki $[Na^+]_i$ floresan şiddetinin nasıl değiştiği incelenmiştir.

Bir stimülatör ile tüm deneysel gruplara ait kardiyomiyositlere verilen farklı frekanstaki uyarılara (0,2 Hz, 0,8 Hz, 1,0 Hz, 1,5 Hz ve 2,0 Hz) karşılık oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddetinin değişim desenleri gözlenmiştir. İzole edilen kardiyomiyositler sodyum green nonratiometrik boya (Na^+ -Green) ile yüklenmişlerdir. Kardiyomiyositlerin boya ile yüklenip yüklenmediğini kontrol etmek amacıyla tüm deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerin Na^+ -Green ile yüklü ve yüklü olmayanların eksitasyon spektrumları ölçülmüştür.

Deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerden Na^+ -Green boyası ile yüklü olanların ve yüksüz kardiyomiyositlerin eksitasyon spektrumları Şekil 3.7. A, B ve C' de (sırasıyla kontrol, diyabet ve insülin ile tedavi edilmiş diyabet grubu) gösterilmiştir. Şekillerde altta kalan 2 eksitasyon spektrumu yüksüz kardiyomiyositlere, üstte kalan eksitasyon spektrumları ise, Na^+ -Green boyası ile yüklü kardiyomiyositlere aittir.

Şekil 3.7. A, B ve C.' de gösterildiği gibi kontrol, diyabet ve insülin ile tedavi edilmiş diyabet gruplara ait kardiyomiyositlerin Na^+ -Green ile yüksüz kardiyomiyositlere göre yaklaşık 2-5 katlık bir artış ile yüklenmişlerdir.

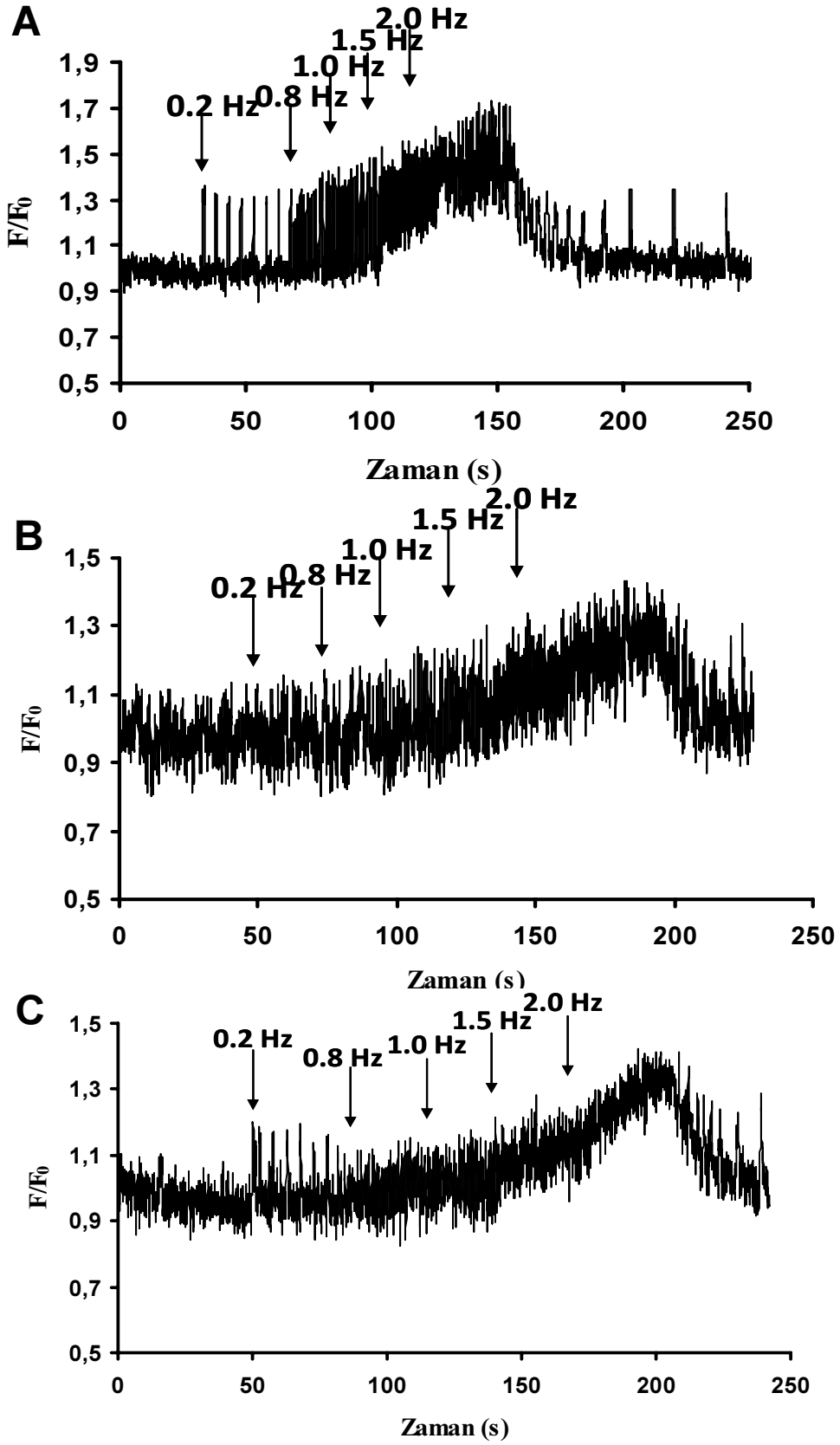


Şekil 3.7: Deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde Na⁺-Green ile yüklenme durumunun gösterimi. En altta kalan 2 eğri Na⁺-Green ile yüklü olmayan kardiyomiyositlerin üstte kalan eğriler ise Na⁺-Green ile yüklü olan kardiyomiyositlerin eksitasyon spektrumlarını göstermektedir.

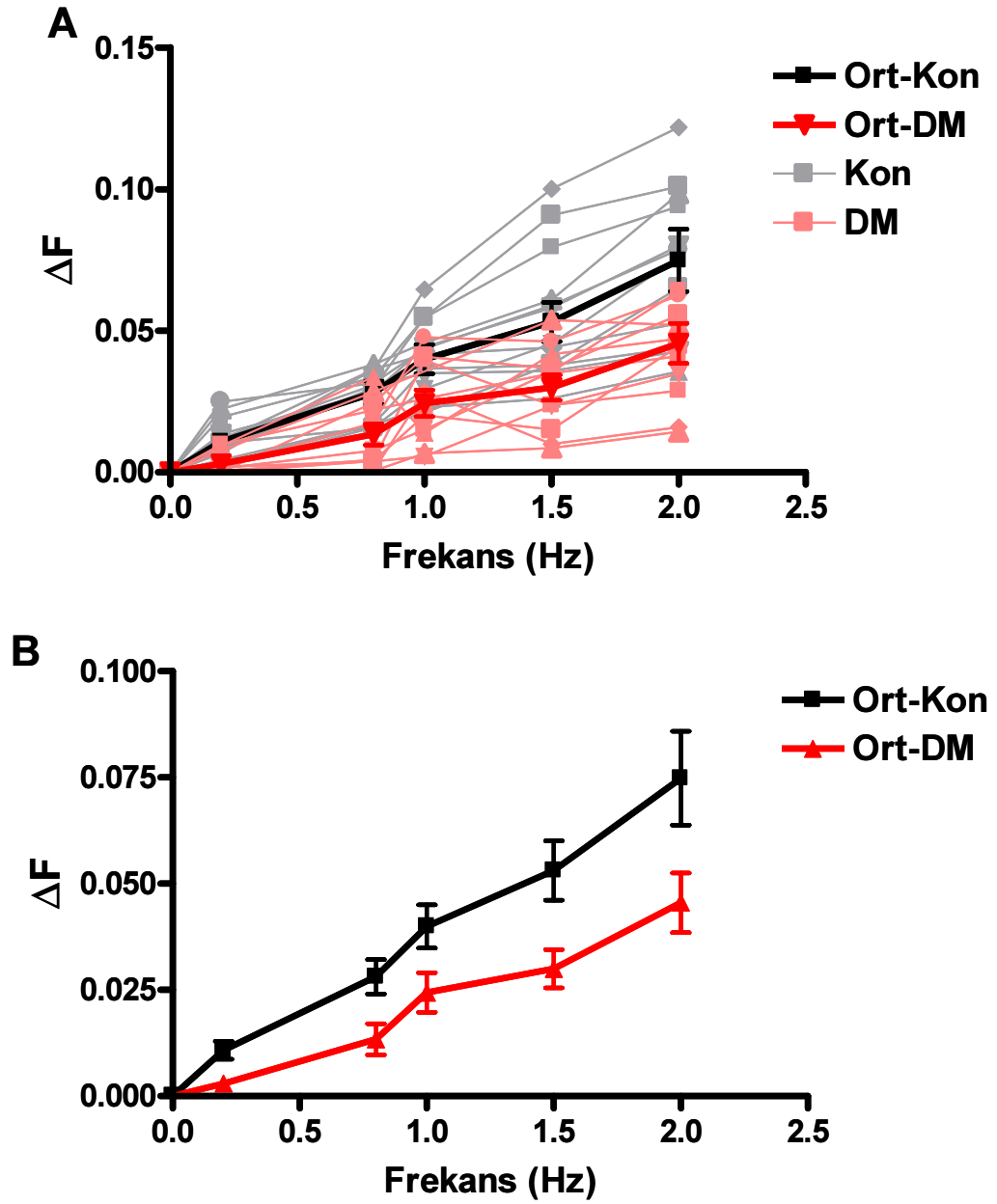
Deneysel grulara ait sıçan kalplerinden izole ettiğimiz kardiyomiyositlere verilen farklı frekanstaki uyarılara (0,2 Hz, 0,8 Hz, 1,0 Hz, 1,5 Hz ve 2,0 Hz) karşılık oluşan örnek $[Na^+]_i$ floresan şiddetleri Şekil 3.8. A, B ve C' de gösterilmiştir.

Şekil 3.8. A' da gösterildiği gibi kontrol grubuna ait kardiyomiyositlerde uygulanan her bir uyarı frekansına karşılık $[Na^+]_i$ floresan şiddeti artmıştır. Şekil 3.8 B.' de diyabet grubuna ait kardiyomiyositlerde uygulanan her bir uyarı frekansına karşılık $[Na^+]_i$ floresan şiddetinin giderek arttığı gösterilmiştir. Şekil 3.8. C' de ise, insülin ile tedavi edilmiş diyabet grubuna ait kardiyomiyositlerde uygulanan her bir uyarı frekansına karşılık $[Na^+]_i$ floresan şiddetinin giderek arttığı gösterilmiştir.

Kontrol ve diyabet grubuna ait 8 farklı kardiyomiyositten ölçtüğümüz farklı uyarı frekanslarına karşı oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddeti sonuçlarının örnekler içinde nasıl dağıldığını ve ortalama eğrileri Şekil 3.9.' da gösterilmiştir.

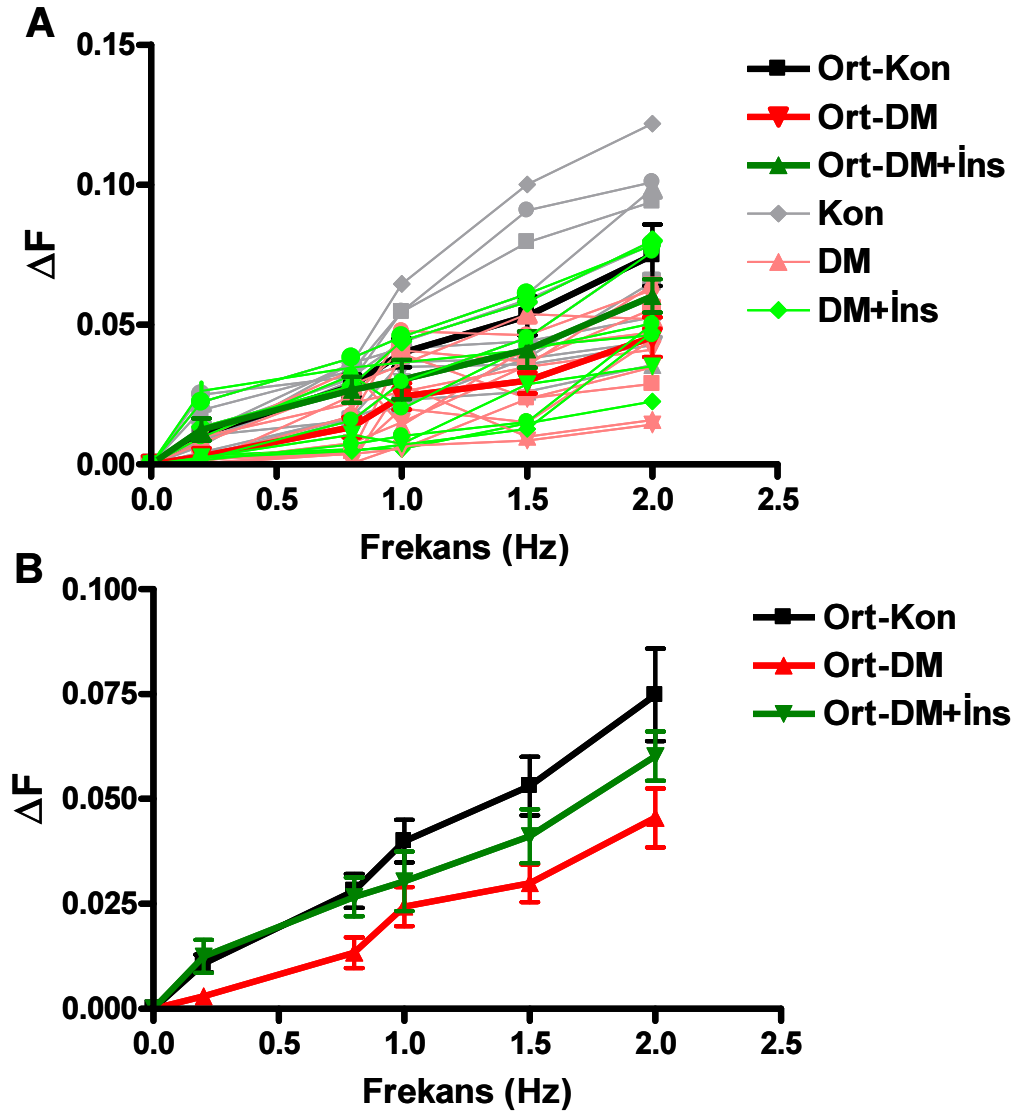


Şekil 3.8: Uyarıya karşı oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddetinin deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde örnek gösterimi. Farklı uyarı frekanslarına karşılık oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddeti eğrisi.



Şekil 3.9: Farklı uyarı frekanslarına (0,2 Hz, 0,8 Hz, 1,0 Hz, 1,5 Hz ve 2,0 Hz) karşılık oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddeti yanıtlarının gösterimi. Her bir kardiyomiyositteki (A) ve ortalama $[Na^+]_i$ floresan şiddeti yanıtları (B) gösterilmiştir. Ort-Kon: kontrol grubuna ait tüm kardiyomiyositlerden ölçülen ortalama $[Na^+]_i$ floresan şiddeti eğrisi, Ort-DM: diyabet grubuna ait tüm kardiyomiyositlerden ölçülen ortalama $[Na^+]_i$ floresan şiddeti eğrisi, Kon: kontrol grubuna ait her bir kardiyomiyositinden ölçülen $[Na^+]_i$ floresan şiddeti eğrileri, DM: diyabet grubuna ait her bir kardiyomiyositinden ölçülen $[Na^+]_i$ floresan şiddeti eğrilerini simgelemektedir.

Diyabet ve insülin ile tedavi edilmiş diyabet grubuna ait 8 farklı kardiyomiyositten ölçtüğümüz farklı uyarı frekanslarına karşı oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddeti sonuçlarının örnekler içinde nasıl dağıldığını ve ortalama eğrileri Şekil 3.10.' da gösterilmiştir.



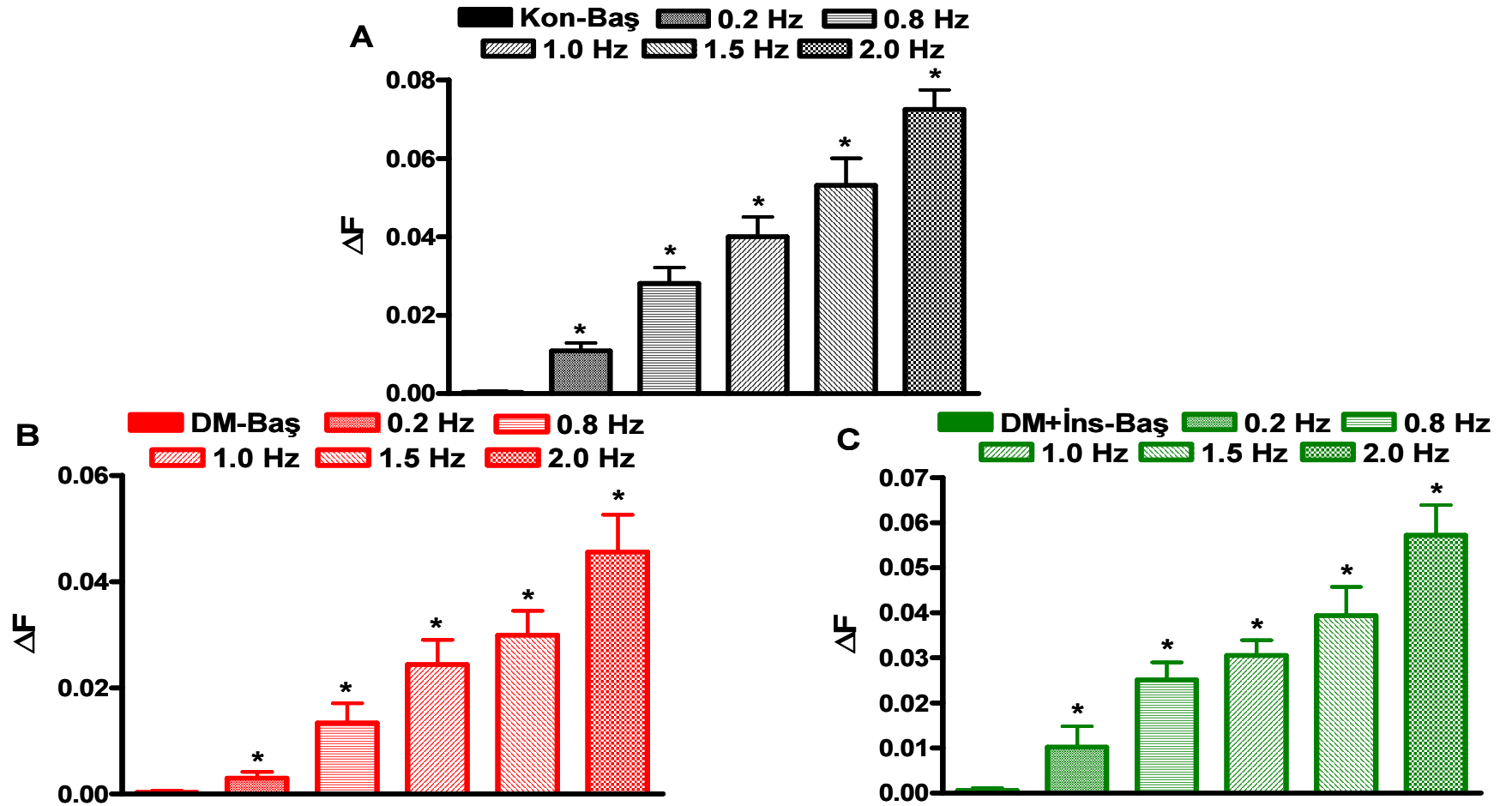
Şekil 3.10: Farklı uyarı frekanslarına (0,2 Hz, 0,8 Hz, 1,0 Hz, 1,5 Hz ve 2,0 Hz) karşılık oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddeti yanıtlarının gösterimi. Her bir kardiyomiyositteki (A) ve ortalama $[Na^+]_i$ floresan şiddeti yanıtları (B) gösterilmiştir. Ort-Kon: kontrol grubuna ait tüm kardiyomiyositlerden ölçülen ortalama $[Na^+]_i$ floresan şiddeti eğrisi, Ort-DM: diyabet grubuna ait tüm kardiyomiyositlerden ölçülen ortalama $[Na^+]_i$ floresan şiddeti eğrisi, Ort-DM+İns: İnsülin ile tedavi edilmiş diyabet grubuna ait tüm kardiyomiyositlerden ölçülen ortalama $[Na^+]_i$ floresan şiddeti eğrisi, Kon: kontrol grubuna ait her bir kardiyomiyositten ölçülen $[Na^+]_i$ floresan şiddeti eğrileri, DM: diyabet grubuna ait her bir kardiyomiyositten ölçülen $[Na^+]_i$ floresan şiddeti eğrilerini simgelemektedir. DM+İns: İnsülin ile tedavi edilmiş diyabet grubuna ait her bir kardiyomiyositten ölçülen $[Na^+]_i$ floresan şiddeti eğrileri.

Farklı uyarı frekanslarına (0,2 Hz, 0,8 Hz, 1,0 Hz, 1,5 Hz ve 2,0 Hz) karşılık oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddeti yanıtlarının tüm deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde uyarı verilmeden önceki (başlangıç) $[Na^+]_i$ floresan şiddetine göre ne kadar arttığıнын ortalama değerleri Şekil 3.11.' de gösterilmiştir.

Şekil 3.11. A' da gösterildiği gibi kontrol grubu kardiyomiyositlerinde her bir farklı uyarı frekansına karşılık oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddeti yanıtlarının başlangıçtaki $[Na^+]_i$ floresan şiddetine göre istatistiksel olarak farklı olduğu hesaplanmıştır.

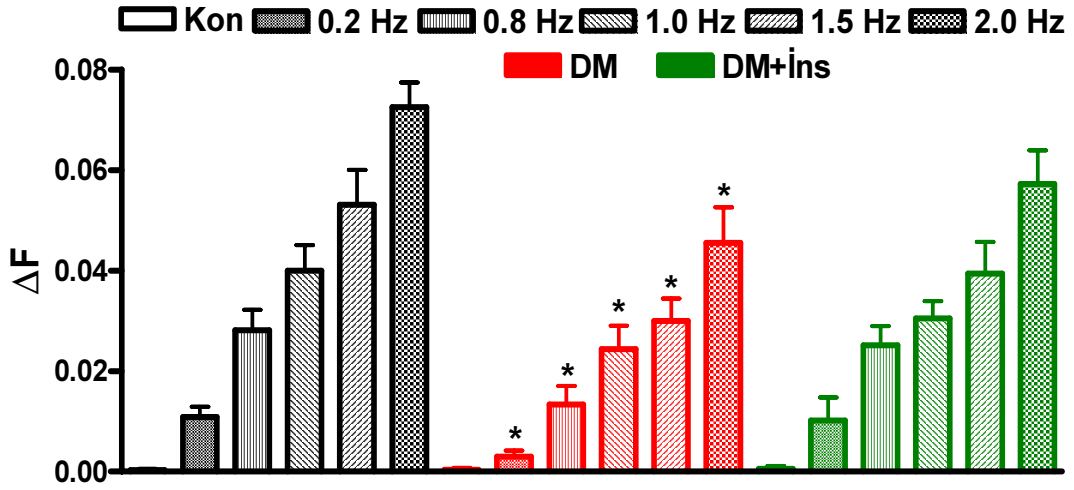
Şekil 3.11. B' de gösterildiği gibi diyabet grubu kardiyomiyositlerinde her bir farklı uyarı frekansına karşılık oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddeti yanıtlarının başlangıçtaki $[Na^+]_i$ floresan şiddetine göre istatistiksel olarak farklı olduğu hesaplanmıştır.

Şekil 3.11. C' de gösterildiği gibi insülin ile tedavi edilmiş diyabet grubu kardiyomiyositlerinde her bir farklı uyarı frekansına karşılık oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddeti yanıtlarının başlangıçtaki $[Na^+]_i$ floresan şiddetine göre istatistiksel olarak farklı olduğu hesaplanmıştır.



Şekil 3.11: Farklı uyarı frekanslarına (0,2 Hz, 0,8 Hz, 1,0 Hz, 1,5 Hz ve 2,0 Hz) karşılık oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddeti yanıtlarının deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerdeki ortalama değerlerinin gösterimi. Kon-Baş, DM-Baş, DM-İns-Baş: uyarı verilmeden önceki (başlangıç) $[Na^+]_i$ floresan şiddeti yanıtlarının sırasıyla kontrol, diyabet ve insülin ile tedavi edilmiş diyabet grubundaki gösterimi. Değerler ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir. * $p < 0,05$ vs. Kon-Baş, DM-Baş ve DM-İns-Baş.

Kontrol, diyabetli ve insülin ile tedavi edilmiş diyabet grubuna ait kardiyomiyositlerde her bir farklı uyarı frekansına karşılık oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddeti yanıtlarının ortalama değerleri, bar grafik olarak Şekil 3.12.' de gösterilmiştir.



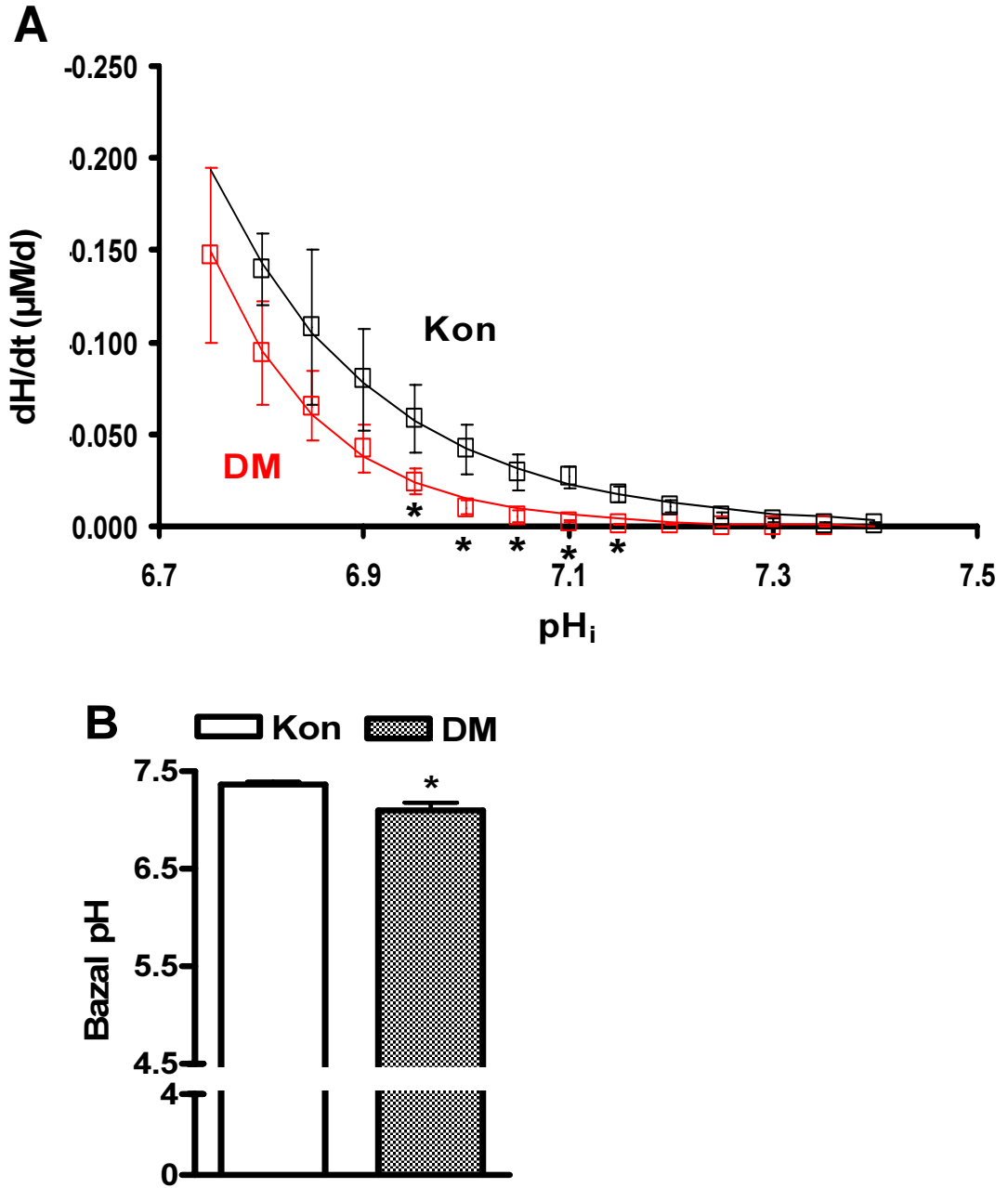
Şekil 3.12: Farklı uyarı frekanslarına (0,2 Hz, 0,8 Hz, 1,0 Hz, 1,5 Hz ve 2,0 Hz) karşılık oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddeti yanıtlarının tüm deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerdeki ortalama değerlerinin gösterimi. Değerler ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir. * $p < 0,05$ vs. Kon.

Şekil 3.12' de gösterildiği gibi diyabet grubuna ait kardiyomiyositlerde her bir farklı uyarı frekansına karşılık oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddeti yanıtlarının kontrol grubuna ait kardiyomiyositlerdeki her bir farklı uyarı frekansına karşılık oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddeti yanıtlarına göre istatistiksel olarak farklı olduğu hesaplanmıştır. İnsülin ile tedavi edilmiş diyabetli gruba ait kardiyomiyositlerde her bir farklı uyarı frekansına karşılık oluşan $[Na^+]_i$ floresan şiddeti yanıtlarının ise kontrol grubuna ait yanıtlara benzemeye yönelik değiştiği gösterilmiştir.

3.5. Deneysel Diyabetin ve İnsülin Tedavisinin Sodyum-Hidrojen Değiş-Tokuşucu Aracılı Olarak Hücre İçi pH Üzerine Etkisi

Tüm deneysel gruplardan elde edilen kardiyomiyositlerde hücre içi pH' nın (pH_i) asidik değere kaydırılması için kardiyomiyositler, 5 dakika amonyum klörür çözeltisi ile süperfüze edilip hızla uzaklaştırılmasına maruz kalmışlardır. Daha sonra hücre

içinin asitten sodyum-hidrojen değiş-tokuşucu (NHE) aracılı kurtulma miktarı ölçülmüştür. Şekil 3.13. A' da kontrol ve diyabet gruplarına ait kardiyomiyositlerde ortalama $d[H^+]/dt$ miktarı pH_i ' ye karşılık gelecek şekilde grafik oluşturulmuştur.



Şekil 3.13: Kontrol ve diyabetli kardiyomiyositlerde farklı pH_i değerine karşılık gelen $d[H]/dt$ miktarlarının (A) ve bazal pH (B) gösterimi. * $p < 0,05$ vs Kon.

Hücre içi bazal pH ortalama \pm SEM değerleri ise, bar grafik şeklinde Şekil 3.13. B' de gösterilmiştir. Bazal pH' nın diyabetli kardiyomiyositlerde kontrol kardiyomiyositlere göre daha küçük olduğu hesaplanmıştır. Bazal pH değeri kontrol grubuna ait kardiyomiyositlerde $7,3 \pm 0,02$ iken diyabet grubuna ait kardiyomiyositlerde $7,1 \pm 0,08$ hesaplanmıştır. Bu bazal pH değerlerine karşılık gelen $d[H^+]/dt$ miktarı Tablo 3.5.' de gösterilmiştir.

Diyabet grubundaki kardiyomiyositlerde serbest H^+ iyonunun sitoplazmadan uzaklaştırılma miktarı kontrol grubundaki kardiyomiyositlere göre daha yavaş bulunmuştur. Bu bulgu diyabet grubunda NHE aktivitesinin daha yavaş olduğunu göstermektedir.

Tablo 3.5: Kontrol ve diyabet grubuna ait bazal pH değerlerinin $d[H^+]/dt$ parametreleri.

	$d[H^+]/dt$ (nM/d) (Kon)	$d[H^+]/dt$ (nM/d) (DM)
pH:7.1	$-26 \pm 4,4$	$-2,2 \pm 0,6^*$
pH:7.3	$-2,0 \pm 0,5$	$-1,3 \pm 0,1^*$

Kısaltmalar kontrol (Kon), diyabet (DM) olarak kullanılmıştır. * $p < 0,05$ vs Kon.

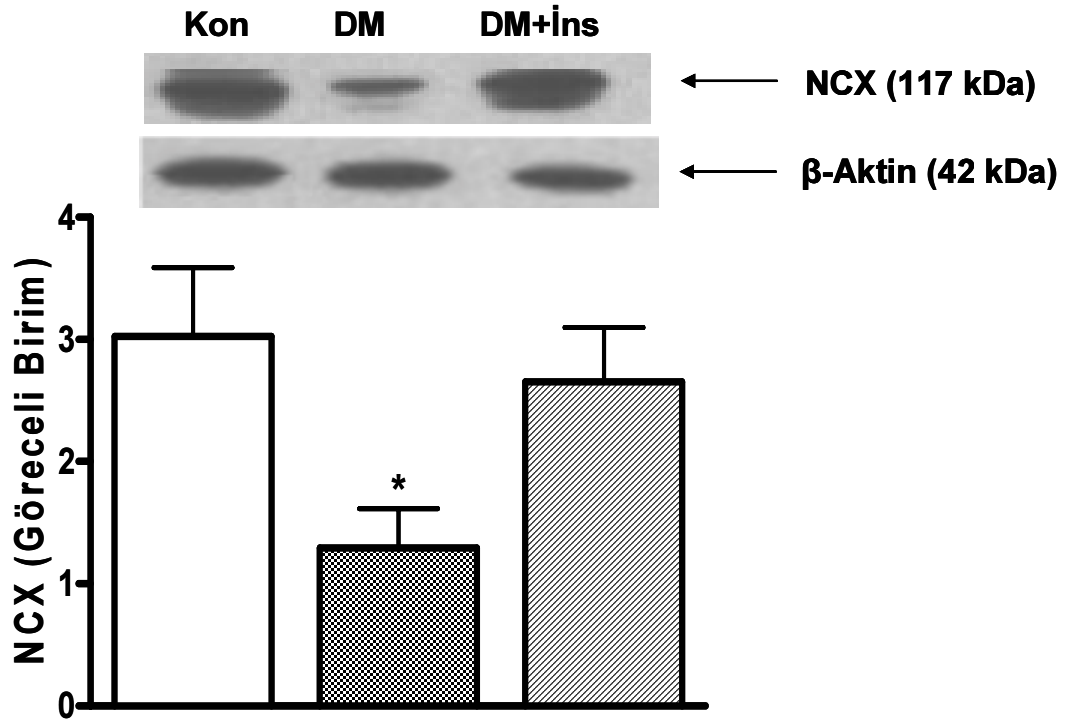
Tablo 3.5.' de gösterildiği gibi kontrol ve diyabet grubuna ait kardiyomiyositlerde ölçülen bazal pH değerlerine karşılık $d[H^+]/dt$ miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.

3.6. Deneysel Diyabetin ve İnsülin Tedavisinin Hücre Zarı Üzerinde Na⁺ Taşıyan Proteinlerin Seviyeleri Üzerine Etkisi

Hücre zarında bulunan Na⁺/Ca²⁺ değiş-tokuşçusu (NCX), NHE, Na⁺/HCO₃⁻ ortak taşıyıcısı ve Na⁺/K⁺/2Cl⁻ ortak taşıyıcısı hücre içine Na⁺ taşınmasında görevli olan proteinlerdir. Bu şekilde hücre içine taşınan ve hücre içinde konsantrasyonu artan Na⁺, nun hücre dışına taşınması ise, Na⁺/K⁺ pompası (NKA) tarafından sağlanır (Verdonck ve ark., 2003).

3.6.1. Sodyum-Kalsiyum Değiş-Tokuşçusu Protein Seviyesi İle İlgili Parametreler

NCX aracılığı ile 1 Ca²⁺ hücre dışına taşınırken 3 Na⁺ da hücre içine taşınmaktadır. Western Blot tekniği ile ölçtüğümüz tüm deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerdeki NCX protein seviyesi Şekil 3.14.' de gösterilmiştir. NCX protein seviyesi sonuçları β-aktin protein sonuçlarına göre normalize edilerek ortalama değerleri bar grafik şekline getirilmiştir.

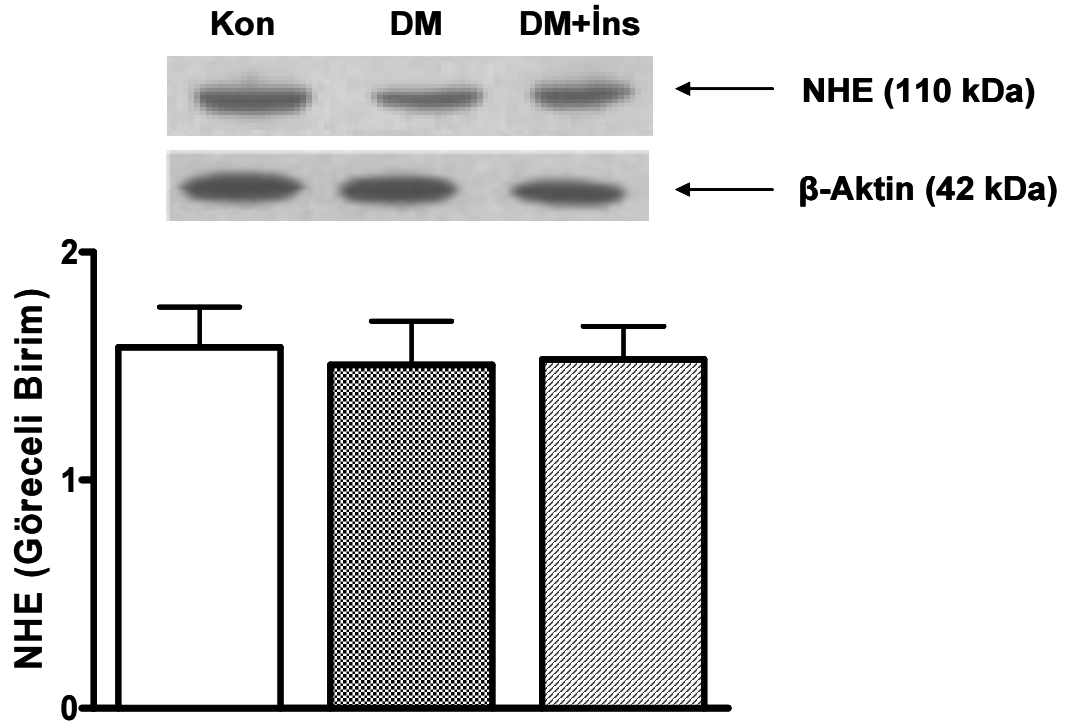


Şekil 3.14: Deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde NCX protein seviyesinin gösterimi. Kon: kontrol grubunu, DM: diyabet grubunu, DM+İns: insülin ile tedavi edilmiş diyabet grubunu simgelemektedir. Değerler ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.* $p < 0,05$ vs Kon.

Şekil 3.14.' de gösterildiği gibi diyabetli gruba ait kardiyomiyositlerde ölçülen NCX protein seviyesinin kontrol grubuna ait kardiyomiyositlere göre azaldığı, insülin ile tedavi edilmiş diyabet grubuna ait kardiyomiyositlerde ise, ölçülen NCX protein seviyesinin normale döndüğü hesaplanmıştır.

3.6.2. Sodyum-Hidrojen Değiş-Tokuşucu Protein Seviyesi İle İlgili Parametreler

NHE, Na^+ nu hücre içine taşıırken H^+ nu hücre dışına taşımaktadır. Western Blot tekniği ile ölçtüğümüz tüm deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerdeki NHE protein seviyesi Şekil 3.15.' de gösterilmiştir. NHE protein seviyesi sonuçları β -aktin protein sonuçlarına göre normalize edilerek ortalama değerleri bar grafik şeklinde sunulmuştur.

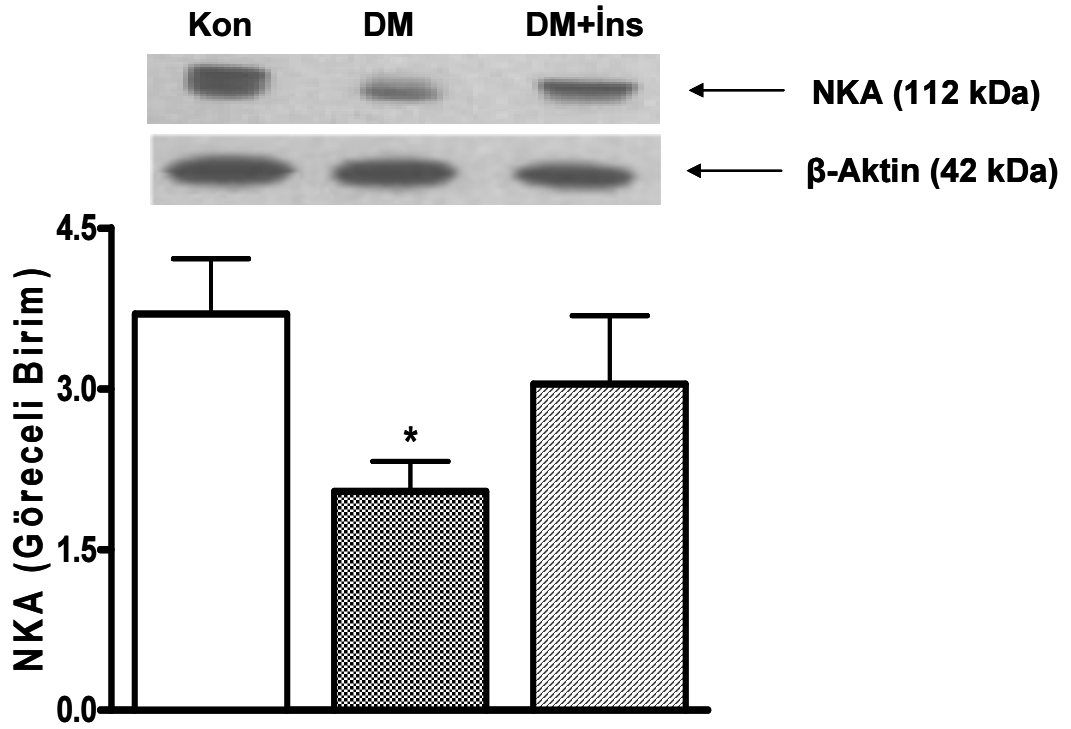


Şekil 3.15: Deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde NHE protein seviyesinin gösterimi. Kon: kontrol grubunu, DM: diyabet grubunu, DM+İns: insülin ile tedavi edilmiş diyabet grubunu simgelemektedir. Değerler ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

Şekil 3.15.' de gösterildiği gibi kontrol, diyabetli ve insülin ile tedavi edilmiş diyabet grubuna ait kardiyomiyositlerde ölçülen NHE protein seviyeleri arasında istatistiksel olarak bir fark gözlemlenmemiştir. Yani diyabet durumundaki kardiyomiyositlerde NHE protein seviyesinin değişmediği söylenebilir.

3.6.3. Sodyum-Potasyum Pompası Protein Seviyesi İle İlgili Parametreler

Hücre içinde artan $[Na^+]$ ' nuna bağlı olarak Na^+ un hücre dışına taşınmasını NKA sağlamaktadır. NKA, ATP enerjisini kullanarak 2 K^+ nun hücre dışına taşınmasını sağlarken 3 Na^+ nun da hücre içine taşınmasını sağlamaktadır. Western Blot tekniği ile ölçtüğümüz tüm deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerdeki NKA protein seviyesi Şekil 3.16.' da gösterilmiştir. NKA protein seviyesi sonuçları β -aktin protein sonuçlarına göre normalize edilerek ortalama değerleri bar grafik şekline getirilmiştir.



Şekil 3.16: Deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde NKA protein seviyesinin gösterimi. Kon: kontrol grubunu, DM: diyabet grubunu, DM+İns: insülin enjekte edilmiş diyabet grubunu simgelemektedir. Değerler ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir. * $p < 0,05$ vs.Kon.

Şekil 3.16.' da gösterildiği gibi diyabetli gruba ait kardiyomiyositlerde ölçülen NKA protein seviyesinin kontrol grubuna ait kardiyomiyositlere göre azaldığı, insülin ile tedavi edilmiş diyabet grubuna ait kardiyomiyositlerde ise, ölçülen NKA protein seviyesinin normale döndüğü hesaplanmıştır.

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, kalpte uyarılma-kasılma çiftlenimi ve $[Ca^{2+}]_i$ homeostazı üzerinde katkısının önemli olduğu hipotezlenen ve çeşitli çalışmalarla da desteklenen hücreiçi serbest Na^+ derişimini ($[Na^+]_i$) değişimini ve bu değişim üzerinde etkili olabilecek faktörlerin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda, basal ve uyarı altında $[Na^+]_i$ değişimleri, Na^+ -duyarlı floresans boyalar (SBFI ve Na^+ -Green) kullanılarak incelenmiştir. Basal $[Na^+]_i$ değerinin diyabetli ve kontrol gruplarında aynı olduğu, fakat elektriksel uyarı ile $[Na^+]_i$ artışının diyabetli grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede daha az olduğu gözlenmiştir. Bu önemli bulgunun altında yatan moleküler mekanizmaları açıklayabilmek amacıyla, çeşitli incelemeler yapılmış olup, öncelikle sol ventrikül papiller kasından kaydedilen aksiyon potansiyeli depolarizasyon fazı incelenmiş, bulgular diyabetli ve kontrol gruplar arasında karşılaştırma yapılmıştır. Ayrıca, depolarizasyona başat olarak katkıda bulunan voltaj-kapılı Na^+ -kanal akımları incelenerek, diyabetli grupta gözlediğimiz aksiyon potansiyeli depolarizasyon fazı yavaşlamasında azalmış olan Na^+ -kanal akımlarının katkısı olabileceği düşünölmüştür. Bu incelemelere ek olarak, katkıda bulunabilecek bir başka parametre olan hücreiçi H^+ derişiminin, hücreiçi pH, ($[H^+]_i$) diyabette nasıl değiştirdiği incelenmiş olup bazal pH_i değerinin diyabetli grupta kontrol gruba göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bir diğer incelemelerimizde, yukarıda fonksiyonel bulgularımızı destekleyebilecek bir seri biyokimyasal ölçümler yapılmıştır. Bu amaçla, Na^+/K^+ -pomпасı (NKA), Na^+/Ca^{2+} -değiş-tokuşçusu (NCX) ve Na^+/H^+ -değiş-tokuşçusunun (NHE) kalp dokusundaki protein seviyeleri Western blot tekniği kullanılarak ölçölmüş ve bunlardan NKA ve NCX seviyelerinin diyabetli grupta önemli derecede azaldığı fakat NHE seviyesinin değişmediği gözlenmiştir. Ayrıca, kullandığımız tip 1 diyabet modelinin (STZ-indöklü) insölin duyarlı diyabeti mimik edebildiğini doğrulamak amacıyla, diyabetli sıçanların bir grubuna insölin tedavisi uygulanmıştır. Bu gruptan elde edilen verilerimizin insölin uygulanmamış diyabetli veya kontrol grubu ile karşılaştırılmasından, çalışmalarımızda kullandığımız diyabet modelimizin tip 1 diyabet olarak kabul görebileceğini de kanıtlamış olduk.

Diyabetli örneklerde (insan ve deneysel hayvan modellerinde) kardiyovasküler hastalıklar arasında diyabetik kardiyomiyopati olarak tanımlanan bir tip kalp fonksiyon bozukluğu (örneğin; uzamış aksiyon potansiyeli süresi, yavaşlamış kalp atım hızı ve azalmış kasılma kuvveti gibi), görülme olasılığı yüksek temel komplikasyonlar arasında yer almaktadır (Rubbler ve ark. 1972). Yapılan fonksiyonel ve biyokimyasal çalışmalarda, sarkolemmal Ca^{2+} pompa aktivitesinin (Makino ve ark., 1987), NKA aktivitesinin (Pierce & Dhalla, 1983), NHE aktivitesinin (Lagodic-Grossman ve ark., 1988) ve sarkoplazmik retikulum Ca^{2+} pompa aktivitesinin (SERCA) aktivitesinin (Lopaschuk ve ark., 1983) deneysel diyabetik hayvanların kalplerinde baskılandığı gösterilmiştir. Benzer bulgular daha önce yaptığımız çalışmalarda da gösterilmiştir. Böylece, bu çalışmada kullandığımız diyabetik hayvanların ölçülen parametrelerinin literatür verileri ile uyumlu oldukları gösterilmiş olup deneylerde kullanılan diyabeti kalp örneklerinin diyabetik kardiyomiyopatiye örnek olabileceği tarafımızdan bu çalışma için de kabul edilmiştir (Ayaz ve ark., 2004; Yaras ve ark., 2005; Yaras ve ark., 2007; Bilginoglu ve ark., 2007; Yaras ve ark., 2008; Bilginoglu ve ark., 2009; Aydemir-Koksoy ve ark., 2010).

Deneylerde kullandığımız hayvanların genel özelliklerini ve fiziksel parametrelerini incelediğimiz zaman, başlangıçta iki gruptaki sıçanların sağlıklı bir görünüme sahip oldukları, ağırlıklarının yaşlarına uygun seviyelerde oldukları ve birbirlerine yakın oldukları görülmektedir. Ancak deney süresince diyabetli grubun kilo kaybettiği görülmüştür. Bu durum kan şekerinin artmasına bağlı olarak gelişen ve diyabette beklenen bir sonuçtur (Fein ve ark., 1980). İnsülin ile tedavi edilmiş diyabetli sıçanların kan şekerlerinde diyabetlilere göre bir azalma ve hatta normal değerlere yaklaşma ve düşük insülin seviyelerinde ise yine normal değerlere dönüşüm gözlenmiştir. Vücut ağırlıkların da ise, diyabetlilere göre anlamlı seviyede artış olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular, STZ uyguladığımız sıçanlarımızın bu şekilde tip-1 diyabeti mimik edebildiğini kanıtlar niteliktedir (Penpargkul ve ark., 1980; Litwin ve ark., 1990; Magyar ve ark., 1992; Chen ve ark., 1994).

Çalışmamızda, diyabetli grup aksiyon potansiyeli depolarizasyon fazında gözlediğimiz yavaşlamanın nedeninin, voltaj-kapılı Na^{+} -kanal akımında (I_{Na})

gözlediğimiz azalmadan kaynaklanabileceği olasılığı kuvvetlidir. Bu yavaşlamada I_{Ca} 'nında azalmasının da katkısı olacağı beklenir. Fakat, biz aynı diyabet modelinde yaptığımız çalışmalarda bu akımın değişmediğini daha önceki çalışmalarımızda gösterdik (Ayaz ve ark., 2004; Yaras ve ark., 2005). Böylece, I_{Na} azalması, yani elektriksel uyarı altında hücre içine Na^+ girişi azalmakta ve böylece hem aksiyon potansiyeli yavaşlamakta (ki $V_{max/2}$ değerimizde bunu doğrulamaktadır) hem de uyarı etkisinde hücre içi $[Na^+]_i$ değişimi daha az (daha küçük değerlerde) gerçekleşmektedir. Bu bulgularımızla kısmen uyumlu olan bir çalışmada, Nygren ve arkadaşları (2007), kalbin ventrikül bölgesinden kaydedilen aksiyon potansiyeli süresinin uzadığını ancak, I_{Na} ile ilişkili olan depolarizasyon hızının değişmediğini ileri sürmüşlerdir.

Diyabetik kardiyomiyopatide, yüksek olasılıkla kalp aritmisine ve ani ölüme (El-Atat ve ark., 2004) sebep olabilen kalpteki mekaniksel (Severson ve ark., 2003) ve elektriksel bozukluklar (Abo ve ark., 1996) gözlenmektedir. Ayrıca, kalp ventrikül aksiyon potansiyelinin süresinin uzaması ve repolarizasyondaki bozukluklar ile kendini gösteren ölümcül aritmi riski ile ilişkilidir (Shimoni ve ark., 1998; Xu ve ark., 2002). Szebeni ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada, kalp ventrikül aksiyon potansiyeli depolarizasyon hızının diyabetik sıçanlarda önemli derecede azaldığını, aksiyon potansiyeli süresinin ise, uzadığını göstermişlerdir. Bu çalışmalar bizim bulgularımızı destekleyen çalışmalardır. Genelde, I_{Na} ölçümü diğer akımlarla karşılaştırıldığında, ölçümü ve verilerin değerlendirilmesi daha zor ve riskli olduğu için, araştırmaların çoğunluğunun I_{Ca} ve I_K 'larına yoğunlaştığı görülmektedir. Önceki çalışmalarımızda, diyabetik sıçanlarda gözlenen aksiyon potansiyeli süresinde gözlediğimiz uzamanın nedenleri olarak repolarize edici K^+ akımlarının azalmasını göstermiştik (Ayaz ve ark., 2004; Ozdemir ve ark., 2005). Bu çalışmada ilk kez olmak üzere diyabetik sıçan kardiyomiyositlerinde, hem aksiyon potansiyeli depolarizasyon hızının yavaşladığını ve hem de I_{Na} azaldığını gözledik. Bu bulgular diğer yandan, diyabetik kardiyomiyositlerde gözlediğimiz uyarıya farklı $[Na^+]_i$ değerlerini de açıklamamızı sağladı. Kısaca, daha az değeri I_{Na} uyarı altında kardiyomiyositlere daha az Na^+ girişini sonuçlamaktadır. Böylece, dinlenme durumunda benzer $[Na^+]_i$ değerleri olmasına karşın, diyabetli kardiyomiyositlerin

uyarıya yanıtları farklı olmaktadır. Bu ise yine uyarı altında bu tip kardiyomiyositlerin farklı bir $[Ca^{2+}]_i$ değişimine neden olacağını işaret etmektedir.

Baartscheer ve arkadaşları (1997) yaptıkları çalışmada, SBFI boyası ile yükledikleri kardiyomiyositlerin ve hücre dışı ortamın eksitasyon spektrumunu kayıt etmişlerdir. Deneylerini Na^+ 'lu (150 mM) ve Na^+ 'suz çözeltiler kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Hücre içinde ölçülen eksitasyon spektrumlarında, Na^+ 'lu ve Na^+ 'suz ortamdaki spektrumlar arasında herhangi bir kayma olmadığını ama Na^+ 'suz ortamdaki spektrumun kuantum veriminin Na^+ 'lu ortamdaki spektruma göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Hücre dışında ölçülen eksitasyon spektrumlarında ise, Na^+ 'lu ortamdaki spektrumun Na^+ 'suz ortamdaki spektruma göre 10 nm kadar daha uzun dalga boylarına kaydığını göstermişlerdir. Çalışmamızda benzer deneysel protokoller kullanıldığından dolayı bulgularımız bu çalışma ile uyumludur.

Despa ve arkadaşları (2002) yaptıkları çalışmada, sıçan ve tavşan kalp ventrikül hücresinde $[Na^+]_i$ nasıl değiştiğini araştırmışlardır. Bu amaç doğrultusunda kalibrasyon yaparak $[Na^+]_i$ nasıl arttığını incelemişlerdir. Kalibrasyon sonucunda $[Na^+]_i$ arttığını göstermişlerdir. Sonra ise, hem sıçan hem de tavşan kalp ventrikül hücrelerinde hücre içine Na^+ girişini ve NKA fonksiyonunu incelemişlerdir. Sonuçta, dinlenim durumundaki $[Na^+]_i$ sıçan kalp ventrikül hücresinde tavşan kalp ventrikül hücresine göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Bunun sebebi olarak da, sıçan kalp ventrikül hücresindeki hücre içine Na^+ taşınımının daha fazla olduğunu ileri sürmüşlerdir. Biz çalışmamızda SBFI boyası ile yüklediğimiz tüm deneysel gruplara ait kardiyomiyositlerde bazal $[Na^+]_i$ değişimini ölçtük. Deney öncesinde kardiyomiyositlerin SBFI ile yüklenip yüklenmediğini kontrol ettik. Kardiyomiyositlerin yaklaşık olarak 2-7 katlık bir artış ile yüklendiğini gözlemledik. Deney grupları arasındaki bazal $[Na^+]_i$ değişimlerinin ise benzer olduğunu gözlemledik.

Tavşan kalp hücresinde, farklı frekanslarda uyarılar (0,5 Hz, 1Hz, 3 Hz) verilerek ölçülen $[Na^+]_i$ ' un, kalp yetmezliği modelindeki hücrelerde kontrol kalp hücrelerine göre arttığı gösterilmiştir (Despa ve ark., 2002). Yine kalp yetmezliği

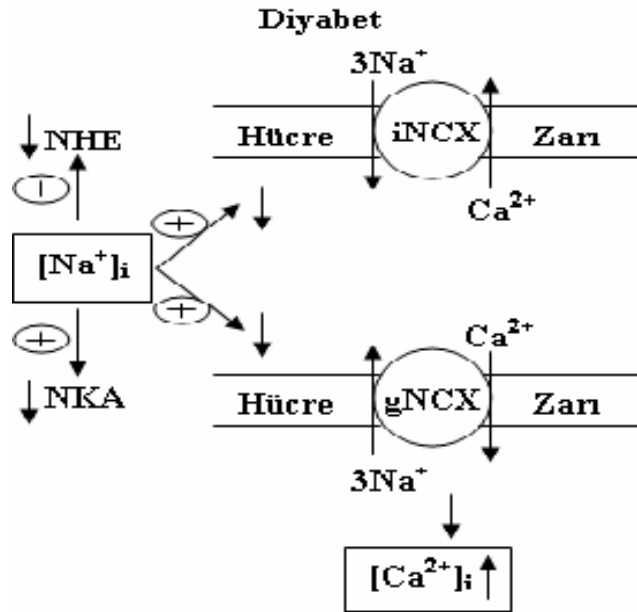
durumunda bazal $[Na^+]_i$ kontrol hücrelerine göre daha fazla olduğu da gösterilmiştir. $[Na^+]_i$ ' a bağlı NKA fonksiyonunun ise değişmediği incelenmiştir. Sonuçta, kalp yetmezliği durumunda olan $[Na^+]_i$ artışı, yine kalp yetmezliği durumunda, aksiyon potansiyeli sırasında NCX ile hücre içine giren Ca^{2+} iyonunun artmış olması ile ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde, Birkedal ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmada, alabalık kalp uyarılma-kasılma çiftleniminde NCX rolünü anlamayı hedeflemişler. Bu amaç doğrultusunda, alabalık kalp ventrikül hücrelerinde $[Na^+]_i$ ' un, dinlenme ve uyarı durumunda nasıl değiştiğini ve sıcaklıkla nasıl değiştiğini incelemişlerdir. Alabalık kalp hücresindeki $[Na^+]_i$ (13,4 mM) diğer memeli kalp hücrelerine göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Diğer memeli kalplere göre alabalık atriyum ve ventrikül hücrelerindeki $[Na^+]_i$ dinlenme ve uyarı (0,2 Hz, 0,5 Hz, 0,8Hz, 1,1 Hz) durumunda farklı olmadığını da göstermişlerdir. Ayrıca, alabalık kalp ventrikül hücrelerinde, dinlenme ve uyarı durumunda sıcaklığın $[Na^+]_i$ üzerine bir etkisinin olmadığını da ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda, kontrol, diyabetli, insülin ile tedavi edilmiş diyabetli gruplara ait kardiyomiyositleri Na^+ -Green floresan boyası ile yükledikten sonra farklı frekanslarda (0,2 Hz, 0,5 Hz, 0,8 Hz, 1 Hz, 1,5 Hz ve 2,0 Hz) elektriksel uyarılar ile, $[Na^+]_i$ floresan şiddetinin nasıl değiştiğini ölçtük. Deney öncesinde kardiyomiyositlerin Na^+ -Green ile yüklü olup olmadığını kontrol ettik. Kardiyomiyositlerin yaklaşık olarak 2-5 katlık artış ile yüklendiğini gözlemledik. Diyabetli gruba ait kardiyomiyositlerde, uyarılara karşı oluşan $[Na^+]_i$ yanıtında kontrol grubuna ait kardiyomiyositlere göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğunu gözlemledik. İnsülin ile tedavi edilmiş diyabetli gruplara ait kardiyomiyositlerde, bu azalmanın geri döndüğünü ve kontrol grubuna ait kardiyomiyositlerin yanıtına benzediğini gözlemledik.

Yaptığımız çalışmada, $[Na^+]_i$ konsantrasyonu üzerine NHE katkısının diyabetik durumda nasıl olduğunu da araştırdık. NHE hücre dışına H^+ -iyonu atarken aynı zamanda hücre içine de Na^+ -iyonu almaktadır. NHE aktivitesinin diyabetli grupta daha yavaş olduğunu gözlemledik. Buna bağlı olarak bazal pH değerlerinin de diyabetli durumda daha asidik olduğunu inceledik. Dolayısıyla NHE' nin bazal pH üzerinde etkili olduğunu söyleyebiliriz. Kontrol ve diyabetli grubun bazal pH değerlerindeki NHE fonksiyonunun da farklı olduğunu gözlemledik. Dolayısı ile

diyabette NHE' nin $[Na^+]_i$ değişimi üzerine etkili olduğunu da söyleyebiliriz. Ayrıca ölçtüğümüz NHE protein seviyesinin de diyabetli durumda değişmemiş olduğunu da gözlemledik. Lagadic-Gossmann ve arkadaşları (1988) yaptıkları çalışmada ise, diyabetli sıçan kalp papiller kasında $[H]_i$ ' nin nasıl değiştiğini incelemişlerdir. Diyabetli durumda $[H]_i$ ' nin değişmediğini göstermişlerdir. Ayrıca NHE' nin aktivitesinin de azaldığını göstermişlerdir. Bu bulgular bizim verilerimizle uyumludur.

NCX aktivitesinin baskılanması diyabetik kardiyomiyopatinin gelişmesinde önemli bir faktördür. Schaffer ve arkadaşları (1997) yaptıkları çalışmada, diyabetik, hiperglisemik ve hipoinsulinemi durumundaki kardiyomiyositlerde NCX aktivitesinin azalmasının nedenini incelemişlerdir. Bunun için, kontrol, yüksek glikoz ile inkübe edilmiş ve hem yüksek glikozla hem de insülin ile inkübe edilmiş hücrelerde NCX aktivitesini ölçmüşlerdir. Sonuçta, yüksek glikoz ile inkübe edilmiş hücrelerdeki NCX aktivitesinin azaldığını, insülin inkübasyonu ile bu azalmanın kontrole benzediğini göstermişlerdir. Ancak NCX mRNA seviyesinin diyabetik durumda değişmediğini göstermişlerdir. Sonuç olarak, NCX aktivitesindeki azalmanın sebebiyle $[Ca^{2+}]_i$ ' nin arttığını, buna bağlı olarak PKC_α aktivasyonunun arttığını ileri sürmüşlerdir. NCX aktivitesinin diyabetik durumda azalmasının nedenini araştıran bir başka grup ise, sebep olarak, NCX protein ve mRNA seviyesinin azaldığını, ayrıca fonksiyon olarak da NCX akımının da azaldığını göstermişlerdir. İnsülin uygulaması ile bu azalmanın normale döndüğünü ve dolayısıyla NCX fonksiyonundaki azalmanın diyabetin bir etkisinin olduğunu yani yüksek glikozun ve insülin eksikliğinin bir sonucu olduğunu ileri sürmüşlerdir (Hattori ve ark., 2000). Bu çalışmada, tüm deneysel gruplara ait kalp hücre zarında NCX protein seviyesini ölçtük. Sonuçta NCX protein seviyesinin diyabetli durumda azaldığını, insülin ile tedavi edilmiş diyabetlilerde bu seviyenin normale döndüğünü gösterdik. Dolayısıyla diyabetin NCX protein seviyesi üzerinde azaltıcı bir etkisi olduğunu ve insülin tedavisi ile insülin reseptörünün aktive olduğunu böylelikle de aktive olan yolakta oluşan proteinlerin NCX üzerinde düzeltici bir etkiye sahip olduklarını sergiledik.

Çalışmamızda, $[Na^+]_i$ değişimleri üzerinde etkili olan mekanizmalardan birisi olan NKA' nın kalp doku homojenatlarından elde edilen membranlarda NKA-protein seviyesini Western blot kullanarak incelenmiştir. Sonuçlarımızda gözlenen diyabetli gruba ait kardiyomiyositlerdeki düşük olan NKA protein seviyesinin (kontrol grubu ile karşılaştırılmasında), NKA' nın diyabetten etkilendiğini (insülin tedavisi ile normale dönebilmekte) ve azalmış olan NKA nın fonksiyonel olarak da azalabileceği hipotezinden yola çıkılarak böylece uyarı sonrası hücrenin dinlenme durumuna geç dönmesine katkıda bulunabileceği düşünülmüştür. Aslında, NKA nın fonksiyonel olarak bozulması kardiyomiyositlerde bazal $[Na^+]_i$ 'nın artmasını sonuçlayacağı düşünülse de bu sürecin gerçekleşmemesi protein seviyesi azalması ile fonksiyonel azalma arasında bire bir ilişkinin olmayacağını işaret etmektedir. Çalışmamızdaki bulgular ışığında, diyabet modelinde kalpte $[Na^+]_i$ homeostazının nasıl değiştiği Şekil 4.1.' de verilen bir şema üzerinde tartışılmıştır.



Şekil 4.1. Diyabet durumunda $[Na^+]_i$ düzenlenmesi.

Sonuç olarak bu çalışmaların sonuçları, diyabetik kardiyomiyopatide $[Ca^{2+}]_i$ yanında $[Na^+]_i$ homeostazının da bozulduğu, bu bozulmanın nedenleri arasında voltaj-kapılı Na⁺ kanallarının inhibe olmasının, değiş-tokuşcuların ve NKA' nın deprese olmasının bulunabileceği, ayrıca $[Na^+]_i$ ve $[Ca^{2+}]_i$ homeostazları arasında bir karşılıklı-etkileşim (cross-talk) olup olmadığının açıklanabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile, uyarılma-kasılma çiftleniminde önemli bir göreve sahip olan Ca^{2+} homeostazının düzenlenmesinde etkili olan $[Na^+]_i$ düzenlemesinin nasıl değiştiği ve nelerden etkilendiği araştırılmaya çalışılmıştır. Ayrıca, tip-1 diyabet modelinde de $[Na^+]_i$ ' un nasıl değiştiği de incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, AP depolarizasyon hızı, AP depolarizasyonunda etkili olan I_{Na} , bazal $[Na^+]_i$ ve elektriksel uyarı altındaki kardiyomiyositlerde $[Na^+]_i$ ve bu değişimlere etkili olabilecek biyokimyasal ölçümler yapılmıştır.

Deneylede kullandığımız sıçanların STZ uygulamasından sonraki 5 hafta sonunda, kan şekeri değerlerinin yükselmesi ve serum insülin seviyelerinin düşmesi sonucunda, sıçanların tip-1 diyabet oldukları gözlemlenmiştir. Ayrıca, insülin ile tedavi edilmiş sıçanlarda ölçtüğümüz AP depolarizasyonunda etkili olan I_{Na} ve $[Na^+]_i$ parametrelerinin normale dönmesi ile de oluşturduğumuz diyabet modelinin tip-1 diyabet olduğu incelenmiştir.

Tip-1 diyabet modelinde, AP repolarizasyon süresinin uzadığı ve depolarizasyon hızının azaldığı gözlenmiştir. Diyabetik kardiyomiyopati durumunda AP depolarizasyon hızının düşük olmasının I_{Na} ' daki azalmanın olabileceği incelenmiştir. Kararlı durumda $[Na^+]_i$ homeostazının düzenli bir şekilde korunduğu ancak elektriksel uyarı altında $[Na^+]_i$ ' un, I_{Na} ' daki azalmaya paralel olarak, tip-1 diyabet modelinde azalma yönünde etkilendiği incelenmiştir.

NHE' nin ise, tip-1 diyabet modelinde daha yavaş çalıştığı, bazal pH değerlerinde ise, $[Na^+]_i$ üzerinde de değiştirici bir etkiye sahip olduğu ve bazal pH' nın daha asidik olmasında etkili olabildiği gözlenmiştir.

Diyabetik durumda, NHE' nin protein seviyesinin değişmediği, ancak NCX ve NKA protein seviyelerinin tip-1 diyabet modelinde azaldığı gözlenmiştir. Buna bağlı

olarak, normal koşullarda, bazal $[Na^+]_i$ dengesini koruyabilecek bir şekilde NCX ve NKA' nın çalıştığı da incelenmiştir.

Bununla birlikte, $[Na^+]_i$ dzenleminde önemli göreve sahip olan NCX ve NKA' nın literatürde var olan bilgilere ek olarak, bazı blokörlerin uygulanması ile fonksiyonel olarak $[Na^+]_i$ üzerinden hangi mekanizmalar ile çalıştığı ve tip-1 diyabet modelinde nasıl değiştiği ve nelerden etkilendiği, bu çalışmanın devamı olarak incelenebilir. Ayrıca yine literatürdeki bilgiler ışıkında, tip-1 diyabet modelinde NCX, NKA ve NHE mRNA seviyelerinin de nasıl değiştiği ve bunun altında yatan mekanizmaların incelenmesi de ek olarak araştırılabilecek konular arasındadır.

ÖZET

Kardiyomiyositlerde Hücre İçi Sodyum Homeostazında Rol Oynayan Faktörlerin İncelenmesi

$[Na^+]_i$ düzenlenimi, kalbin uyarılma-kasılma çiftlenimi üzerinde önemli bir göreve sahip olan Ca^{2+} sinyal mekanizması üzerinde, Na^+/Ca^{2+} değiş-tokuşçusu (NCX) aracılığı ile önemli bir etkiye sahiptir. Ayrıca, voltaj-kapılı Na^+ kanalı ve Na^+/H^+ değiş-tokuşçusu (NHE), $[Na^+]_i$ düzenleniminde önemli göreve sahip olan diğer mekanizmalardır. Bu çalışmanın amacı, $[Na^+]_i$ düzenleminde rol oynayan bu mekanizmaları araştırmak ve tip-1 diyabet modelinde $[Na^+]_i$ düzenleminde görev alan bu mekanizmaların nasıl değiştiğini ve nelerden etkilendiğini incelemektir. STZ uygulaması ile oluşturulmuş, 5 haftalık diyabetik ve kontrol sıçan kalp ventrikül papiller kasından mikroelettrot tekniği ile AP ölçüldü ve ölçülen AP'lerin depolarizasyon hızları nümerik bir matematiksel işlem ile hesaplandı. Sonrasında, AP depolarizasyonundan sorumlu olan I_{Na} tüm-hücre voltaj-kenetleme tekniği ile ölçüldü. Elde edilen sonuçlara bağlı olarak $[Na^+]_i$ ' un bazal floresan şiddeti SBFI floresan boyası kullanılarak ve $[Na^+]_i$ ' un elektriksel uyarı altında nasıl değiştiği ise Na^+ -Green floresan boyası kullanılarak incelendi. Ayrıca, yine $[Na^+]_i$ düzenleminde görevli olan NHE' nin de diyabette nasıl değiştiği ve pH_i ölçümü amonyum-prepuls yöntemi ile incelendi. Bu sonuçlara ek olarak da, NHE, NCX ve Na^+/K^+ pompası (NKA) protein seviyeleri Western Blot tekniği ile ölçüldü. Sonuçta, tip-1 diyabet olan sıçanların, kalp ventrikül papiller kasından ölçtüğümüz AP' nin repolarizasyon süresinin uzadığı ve depolarizasyon hızının azaldığı gözlenmiştir. Bunun ise, diyabetik kardiyomiyositlerde ölçülen, I_{Na} ' daki azalmadan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca, elektriksel uyarı altında ölçülen $[Na^+]_i$ ' un da diyabetik kardiyomiyositlerde azalması, bu sonucu desteklemektedir. Diyabet modelinde yavaşlamış olarak bulduğumuz NHE' nin, bazal pH değerlerinde ve $[Na^+]_i$ üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Ek olarak ölçtüğümüz NCX ve NKA protein seviyelerinin ise, diyabet modelinde azaldığı gözlenmiştir. Bu tez çalışması ile, STZ uygulaması ile oluşturduğumuz diyabet modelinin tip-1 diyabet olduğu, elektriksel uyarı altında, $[Na^+]_i$ ' un tip-1 diyabet modelinde azalan I_{Na} ' na bağlı olarak azaldığı ve NHE' nin de diyabet durumunda daha yavaş çalıştığı gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Hücre İçi pH, Hücre İçi Sodyum, Na^+/Ca^{2+} Değiş-Tokuşçusu, Na^+/H^+ Değiş-Tokuşçusu, Na^+/K^+ Pompası, Tip-1 Diyabet, Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi.

SUMMARY

Investigation of the Factors Playing Roles in Intracellular Sodium Ion Homeostasis of Cardiomyocytes

In cardiomyocytes, $[Na^+]_i$ is an important modulator of excitation-contraction coupling via affecting $[Ca^{2+}]_i$ due to Na^+/Ca^{2+} exchanger (NCX). Another two-important Na^+ influx pathway on sarcolemma is voltage-gated Na^+ channels and Na^+/H^+ exchanger (NHE). We aimed to investigate the role of the mechanisms on $[Na^+]_i$ homeostasis and how these mechanisms would change in type-1 diabetes (streptozotocin, STZ-induced diabetes) model. First, action potentials (AP) were recorded from ventricular papillary muscles of control and 5-week STZ-induced diabetic rat hearts using the microelectrode technique. The half maximum upstroke velocity was calculated via a mathematical formula. Then, voltage-gated Na^+ channel currents (I_{Na}) were recorded using whole-cell voltage-clamp technique, is responsible of AP upstroke. Depends of these results, basal $[Na^+]_i$ was measured using SBFI fluorescent dye and $[Na^+]_i$ under the electrical stimulus was measured using Na^+ -Green fluorescent dye. Furthermore, how NHE, is an another responsible mechanism of $[Na^+]_i$ homeostasis, would change in diabetes mellitus, using the pH_i recovery via the ammonium-prepuls (NH_4Cl) method. In addition, protein levels of NCX, NHE and Na^+/K^+ pump (NKA) were measured using the Western Blot technique. In results, AP duration of repolarization was prolonged and half maximum of AP upstroke was reduced in ventricular papillary muscles, due to the reduced I_{Na} in the cardiomyocytes isolated from STZ-induced diabetic rat hearts. Also, the reduced response of $[Na^+]_i$ to electrical stimulus supported these results. Reduced function of NHE in type-1 diabetes model impressed the basal pH values. In addition, NCX, NKA protein levels were decreased in diabetes. Finally, in this study, we showed that the STZ-induced diabetes was type-1 diabetes model and $[Na^+]_i$ under electrical stimulus was decreased by reduced I_{Na} in diabetes. Also, NHE function was less slowly in diabetes model than control groups.

Key Words: Excitation-Contraction Coupling, Intracellular pH , Intracellular Sodium, Na^+/Ca^{2+} Exchanger, Na^+/H^+ Exchanger, Na^+/K^+ Pump, Type-1 Diabetes.

KAYNAKLAR

- ABO, K., ISHIDA, Y., YOSHIDA, R., HOZUMI, T., UENO, H., SHIOTANI, H., MATSUNAGA, K., KAZUMI, T. (1996). Torsade de pointes in NIDDM with long QT intervals. *Diabetes Care*. **19**:1010.
- ABRIEL, H. (2007). Roles and regulation of the cardiac sodium channel Nav1.5: recent insights from experimental studies. *Cardiovasc Res*. **76**:381-389.
- ALBERTS, B., ROBERTS, K., BRAY, D., RAFF, M., WALTER, P., JOHNSON, A. (2009). Essential cell biology. (3rd ed). *Garland*.
- ALLEN, D.G. (1977). On the relationship between action potential duration and tension in cat papillary muscle. *Cardiovasc Res*. **11**:210-218.
- ALLEN, D.G., KURIHARA, S. (1982). The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. *J Physiol*. **327**:79-94.
- ALLEN, D.G., NICHOLAS, C.G., SMITH, G.L. (1988). The effects of changes in muscle length during diastole on the calcium transient in ferret ventricular muscle. *J Physiol*. **406**:359-370.
- ALLEN, D.G., XIAO, X-H. (2003). Role of cardiac Na⁺/H⁺ exchanger during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res*. **57**:934-941.
- ALVAREZ, J.L., AIMOND, F., LORENTE, P., VASSORT, G. (2000). Late post-myocardial infarction induces a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. **32**:1169-1179.
- ANNUNZIATO, I., PIGNATARO, G., DI RENZO, G.F. (2004). Pharmacology of brain Na⁺/Ca²⁺ exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives. *Pharmacol Rev*. **56**:633-654.

- ANTZELEVITCH C., YAN G.X., SHIMIZU W. (1999) Transmural dispersion of repolarization and arrhythmogenicity: the Brugada syndrome versus the long QT syndrome. *J Electrocard*; **32**:158-165.
- ASHAMALLA S.M., NAVARRO D., WARD C.A. Gradient of sodium current across the left ventricular wall of adult rat heart. *J Physiol* 2001; **536**:439-443.
- ATKINSON, M.A., EISENBARTH, G.S. (2001). Type-1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. **358**:221-229.
- AYAZ, M., OZDEMIR, S., UGUR, M., VASSORT, G., TURAN, B. (2004). Effects of selenium on altered mechanical and electrical cardiac activities of diabetic rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **426**: 83-90.
- AYDEMIR-KOKSOY, A., BILGINOGLU, A., SARIAHMETOGLU, M., SCHULZ, R., TURAN, B. (2010). Antioxidant treatment protects diabetic rats from cardiac dysfunction by preserving contractile protein targets of oxidative stress. *J Nutr Biochem.* **21**:827-833.
- BAARTSCHEER, A., SCHUMACHER, C.A., FIOLET, J.W.T. (1997). Small changes of cytosolic sodium in rat ventricular myocytes measured with SBFI in emission ratio mode. *J Mol Cell Cardiol.* **29**:3375-3383.
- BAARTSCHEER, A., HARDZIYENKA, M., SCHUMACHER, C.A., BELTERMAN, C.N., VAN BORREN, M.M., VERKERK, A.O. ET AL. (2008). Chronic inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger causes regression of hypertrophy, heart failure, and ionic and electrophysiological remodelling. *Br J Pharmacol.* **154(6)**:1266-75.
- BAETZ D., BERNARD M., PINET C., TAMAREILLE S., CHATTOU S., EL BANANI H., COULOMBE A., FEUVRAY D. Different pathways for sodium entry in cardiac cells during ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem* 2003; **242**:115-120.
- BALNAVE, C.D., VAUGHAN-JONES, R.D. (2000). Effect of intracellular pH on spontaneous Ca²⁺ sparks in rat ventricular myocytes. *J Physiol.* **528**:25-37.

- BALUCHNEJADMOJARAD, T., ROGHANI, M., IMANI, A. (2004). Dose-dependent effect of captopril on aortic reactivity of S-diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **31**:342-347.
- BARRY, W.H., BRIDGE, J.H. (1993). Intracellular calcium homeostasis in cardiac myocytes. *Circulation.* **87**:1806-1815.
- BERRIDGE, M.J. (2006). Remodelling Ca²⁺ signalling systems and cardiac hypertrophy. *Biochem Soc Trans.* **34**:228-31.
- BERS, D.M., BRIDGE, J.H.B. (1989). Relaxation of rabbit ventricular muscle by Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum calcium pump. Ryanodine and voltage sensitivity. *Circ Res.* **65**:334-342.
- BERS, D.M. (1991). Species differences and the role of sodium-calcium exchange in cardiac muscle relaxation. *Ann NY Acad Sci* **639**:375-385.
- BERS, D.M., LEDERER, W.J., BERLIN, J. (1991). Intracellular Ca transients in rat cardiac myocytes: role of Na-Ca exchange in excitation-contraction coupling. *Am J Physiol.* **258**:C944-C954.
- BERS DM. (2001). Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Dordrecht, the Netherlands: *Kluwer Academic Publishers.*
- BERS, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* **415**: 198-204.
- BERS, D.M., EISNER, D.A., VALDIVIA, H.H. (2003). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ and heart failure: roles of diastolic leak and Ca²⁺ transport. *Circ Res.* **93**(6):487-490.
- BERS D, DESPA S. (2006). Cardiac myocytes Ca²⁺ and Na⁺ regulation in normal and failing hearts. *J Pharmacol Sci.* **100**:315-322.
- BILGINOGLU, A., CICEK, F.A., UGUR, M., GURDAL, H., TURAN, B. (2007). The role of gender differences in beta-adrenergic receptor responsiveness of diabetic rat heart. *Mol Cell Biochem.* **305**(1-2):63-69.

- BILGINOGLU, A., SEYMEN, A., TUNCA, Y., ZEYDANLI, E., AYDEMIR-KOKSOY, A., TURAN, B. (2009). Antioxidants but not doxycycline treatments restore depressed beta-adrenergic responses of the heart in diabetic rats. *Cardiovasc Res.* **9(1)**:21-29.
- BIRKEDAL R., SHIELS HA. High $[Na]_i$ in cardiomyocytes from rainbow trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;**293**:R861-R866.
- BORON, W.F. (1989). Cellular buffering and intracellular pH. In: Seldin, T., Giebish G. Eds. The regulation of Acid-base balance. *New York:Raven Press Ltd.*
- BOUCHARD, R.A., CLARK, R.B., GILES, W.R. (1995). Regulation of unloaded cell shortening in isolated rat ventricular myocytes by sarcolemmal Na^+ / Ca^{2+} Exchange. *J Physiol.* **469**:583-599.
- BOUCHARD, R.A., CLARK, R.B., GILES, W.R. (1995). Effects of action potential duration on excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Circ Res.* **76**:790-801.
- BOUNTRA, C., VAUGHAN-JONES, R.D. (1989). Effect of intracellular and extracellular pH on contraction in isolated, mammalian cardiac muscle. *J Physiol.* **418**:163-87.
- BRACKEN, N.K., SINGH, J., WINLOW, W., HOWARTH, F.C. (2003). Mechanisms underlying contractile dysfunction in streptozotocin-induced type 1 and type 2 diabetic cardiomyopathy. In: *Atherosclerosis, hypertension and diabetes*, Ed: G.N. Pierce, M. Nagano, P. Zahradka, N.S. Dhalla. Boston: Kluwer Academic Publishers, p: 386-407.
- BRODDE O.E, O'HARA N, ZERKOWSKI H.R, ROHM N. (1984) Human cardiac beta-adrenoceptors: both beta 1- and beta 2-adrenoceptors are functionally coupled to the adenylate cyclase in right atrium. *J Cardiovasc Pharmacol.* **6(6)**:1184-91.
- BUCKLER K.J., VAUGHAN JONES R.D. Application of a new pH-sensitive fluoroprobe (carboxy-SNARF-1) for intracellular pH measurement in small, isolated cells. *Pflugers Arch* 1990;**417**:234-9.

- CAMPBELL R.K. (1984) Ask a pharmacist. Are there any methods than can be used to determine the specific effect that a drug has on blood glucose levels? *Diabetes Educ.* **10(1)**:53.
- CARAFOLI, E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Ann Rev Biochem.* **56**:395-433.
- CASCIO, W.E., YAN, G.X., KLEBER, A.G. (1992). Early changes in extracellular potassium in ischemic rabbit myocardium. The role of extracellular carbon dioxide accumulation and diffusion. *Circ Res.* **70**:409-22.
- CHARLEMAGNE, D., ORLOWSKI, J., OLIVIERO, P., ET AL. (1994). Alteration of Na,K-ATPase subunit mRNA and protein levels in hypertrophied rat heart. *J Biol Chem.* **269**:1541-1547.
- CHATTOU, S., DIACON, J., FEUVRAY, D. (1999). Decrease in sodium-calcium Exchange and calcium currents in diabetic rat ventricular myocytes. *Acta Physiol Scand* **166**:137-144.
- CHATTOU, S., COULOMBE, A., DIACONO, J., GRAND, B., JOHN, G., FEUVRAY, D. (2000). Slowly inactivating component of sodium current in ventricular myocytes is decreased by diabetes and partially inhibited by known Na⁺-H⁺ exchange blockers. *J Mol Cell Cardiol.* **32**:1181-1192.
- CHEN, S., YUAN, C.M., HADDY, F.J., PAMNANI, M.B. (1994). Effect of administration of insulin on streptozotocin-induced diabetic hypertension in rat. *Hypertension.* **23**:1046-1050.
- CHEN, L., LU, X.Y., LI, J., FU, J.D., ZHOU, Z.N., YANG, H.T. (2006). Intermittent hypoxia protects cardiomyocytes against ischemia-reperfusion injury-induced alterations in Ca²⁺ homeostasis and contraction via the sarcoplasmic reticulum and Na⁺/Ca²⁺ exchange mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol.* **290**:C1221-C1229.
- CHEN, Z-H., LI, T., CHEN, Z-B., LUO, B., SUN, R-P. (2009). Prevention of beta cell dysfunction and apoptosis by adenoviral gene transfer of rat insulin-like growth factor 1. *Chinese Med J.* **122(18)**:2159-2164.

- CHIAMVIMONVAT N., KARGACIN M.E., CLARK R.B., DUFF H.J. Effects of intracellular calcium on sodium current density in cultered neonatal rat cardiac myocytes. *J Physiol* 1995;**483**:307-318.
- CHOI, H.S., TRAFFORD, A.W., ORCHARD, C.H., EISNER, D.A. (2000). The effect of acidosis on systolic Ca^{2+} and sarcoplasmic reticulum calcium content in isolated rat ventricular myocytes. *J Physiol*. **529**:661-8.
- CHOI, K.M., ZHONG, Y., HOIT, B.D., GRUPP, I.L., HAHN, H., DILLY, K.W., GUATIMOSIM, S., LEDERER, W.J., MATLIB, M.A. (2002). Defective intracellular Ca^{2+} signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. **283**: H1398-H1408.
- CHRISTENSEN, P.K., GALL, M.A., MAJOR-PEDERSON, A., SATO, A., ROSSING, P., BREUM, L., PIETERSEN, A., KASTRUP, J., PARYING, H.H. (2000). QT interval length and QT dispersion as predictors of mortality in patients with non-insulin dependent diabetes. *Scand J Clin Lab Invest*. **60**:323-332.
- CINAR, M.G., ULKER, S., ALPER, G., ET AL. (2001). Effect of dietary vitamin E supplementation on vascular reactivity of thoracic aorta in S-diabetic rats. *Pharmacology*. **62**:56-64.
- CINGOLANI, H.E., ENNIS, I.L. (2007). Sodium-hydrogen exchanger, cardiac overload, and myocardial hypertrophy. *Circulation*. **115(9)**:1090-100.
- CLEEMAN, L., MORAD, M. (1991). Role of Ca^{2+} channel in cardiac excitatio-contraction coupling in the rat: evidence from Ca^{2+} transients and contraction. *J Physiol*. **432**:283-312.
- COUNILLON, L., POUYSSEGUR, J. (1995). Structure-function studies and molecular regulation of the growth factor activatable sodium-hydrogen exchanger (NHE-1). **29**:147-154.
- DARMELLAH, A., BAETZ, D., PRUNIER, F., TAMAREILLE, S., RÜCKER, C., FEUVRAY, M.D. (2007). Enhanced activity of the myocardial Na^+/H^+ exchanger

contributes to left ventricular hypertrophy in the goto-kakizaki rat model of type 2 diabetes: critical role of Akt. *Diabetologia*. **50**:1335-1344.

DESPA, S., ISLAM, M.A., POGWIZD, S.M., BERS, D.M. (2002). Intracellular [Na] and Na⁺-pump rate in rat and rabbit ventricular myocytes. *J Physiol*. **539**:133-143.

DESPA, S., ISLAM, M.A., WEBER, C.R., POGWIZD, S.M., BERS, D.M. (2002). Intracellular Na⁺ concentration is elevated in heart failure, but Na/K pump function is unchanged. *Circulation*. **105**:2543-2548.

DESPA, S., BERS, D.M. (2003). Na/K pump current and [Na]_i in rabbit ventricular myocytes: local [Na]_i depletion and buffering. *Biophys J*. **84**:4157-4166.

DHALLA, N.S., PIERCE, G.N., PANAGIA, V., SINGAL, P.K., BEAMISH, R.E. (1982). Calcium movements in relation to heart function. *Basic Res Cardiol*. **77**:117-139.

DHALLA, N.S., PIERCE, G.N., INNES, I.R., BEAMISH, R.E. (1985). Pathogenesis of cardiac dysfunction in diabetes mellitus. *Can. J. Cardiol*. **1**: 263-281.

DOERING, A.E., LEDERER, W.J. (1993). The mechanism by which cytoplasmic protons inhibit the sodium-calcium exchanger in guinea-pig heart cells. *J Physiol*. **466**:481-499.

DUCKWORTH, W.C., BENNETT, R.G., HAMEL, F.G. (1998). Insulin degradation: progress and potential. *Endocrine Rev*. **19 (5)**: 608–624.

EISNER, D.A., CHOI, H.S., DIAZ, M.E., O'NEILL, S.C., TRAFFORT, A.W. (2000). Integrative analysis of calcium cycling in cardiac muscle. *Circ Res*. **87**:1087-1094.

EL-ATAT, F.A., MCFARLANE, S.I., SOWERS, J.R., BIGGER, J.T. (2004). Sudden cardiac death in patients with diabetes. *Curr Diab Rep*. **4**:187-193.

ENDO, M. (2008). Cardiac Ca²⁺ signaling and Ca²⁺ sensitizers. *Circ J*. **72**:1915-1925.

- FABIATO, A., FABIATO, F. (1978). Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J Physiol.* **276**:233-55.
- FABIATO, A. (1985). Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac purkinje cell. *J Gen Physiol.* **85**:291-320.
- FEIN, F., KORNSTEIN, L., STROBECK, J., SONNENBLICK, E. (1980). Altered myocardial mechanics in diabetic rats. *Circ. Res.* **47**: 922-33.
- FEIN F.S., ARONSON R.S., NORDIN C., MILLER-GREEN B. & SONNENBLICK E.H. (1983). Altered myocardial response to ouabain in diabetic rats:mechanics and electrophysiology. *J Mol Cell Cardiol.* **15**:769-784.
- FENG, N.C., SATOH, H., URUSHIDA, T, KATOH, H., TERADA, H., WATANABE, Y., HAYASHI, H. A (2006). Selective inhibitor of Na⁺/Ca²⁺ exchanger, SEA0400, preserves cardiac function and high energy phosphatase against ischemia.reperfusion injury. *J Cardiovasc. Pharmacol.* **47**:263–270.
- FLIEGEL, L., FRÖHLICH, O. (1993). The Na⁺/H⁺ exchanger: an update on structure, regulation and cardiac physiology. *Biochem J.* **296**:273-285.
- FRAYSSE, B., ROUAUD, T., MILLOUR, M., FONTAINE-PERUS, J., GARDAHAUT, M., LEVITSKY, D. (2001). Expression of the Na(+)/Ca(2+) exchanger in skeletal muscle. *Am J Physiol.* **280**:C146-C154.
- GANGULY, P.K., PIERCE, G.N., DHALLA, N.S. (1983). Defective sarcoplasmic reticular calcium transport in diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol.* **244**:E528-E535.
- GAUTHIER C, TAVERNIER G, CHARPENTIER F, LANGIN D, LE MAREC H. (1996) Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest.* **98**(2):556-62.
- GERBI, A., BARBEY, O., RACCAH, D., COSTE, T., JAMME, I., NOUVELOT, A., OUAFIK, L., LEVY, S., VAGUE, P., MAIXENT, J.M. (1997). Alteration of Na,K-

ATPase isoenzymes in diabetic cardiomyopathy: effect of dietary supplementation with fish oil (n-3 fatty acids) in rats. *Diabetologia*. **40**:496-505.

GOLFMAN, L., DIXON, I.M.C., TAKEDA, N., LUKAS, A., DAKSHINAMURTI, K., DHALLA, N.S. (1998). Cardiac sarcolemmal Na^+ - Ca^{2+} exchange and Na^+ - K^+ ATPase activities and gene expression in alloxan-induced diabetes in rats. *Mol Cell Biochem*. **188**:91-101.

GOMEZ, A.M., GUATIMOSIM, S., DILLY, K., VASSORT, G., LEDERER, W.J. (2001). Heart failure following myocardial infarction: altered excitation-contraction coupling. *Circulation*. **104**:688-693.

GOMEZ, A.M., SCHWALLER, B., PORZIG, H., VASSORT, G., NIGGLI, E., EGGER, M. (2002). Increased exchange current but normal Ca^{2+} transport via Na^+ - Ca^{2+} exchange during cardiac hypertrophy after myocardial infarction. *Circ Res*. **91**:323-330.

GRANT, A.O. Cardiac ion channels. (2009). *Circ Arrhythmia Electrophysiol*. **2**:185-194.

GUYTON, A.C. & HALL, J.E. (2006). *Textbook of Medical Physiology* (11th ed.) Philadelphia: Elsevier Saunder.

HALESTRAP, A.P., WANG, X., POOLE, R.C., JACKSON, V.N., PRICE, N.T. (1997). Lactate transport in heart in relation to myocardial ischemia. *Am J Cardiol*. **80**:17A-25A.

HAMMARSTRÖM A.K, GAGE P.W. (2002). Hypoxia and persistent sodium current. *Eur Biophys J*. **31(5)**:323-30.

HAN, F., BOSSUYT, J., DESPA, S., TUCKER, A.L., BERS, D.M. (2006). Phospholemman phosphorylation mediates the protein kinase C-dependent effects on Na^+/K^+ pump function in cardiac myocytes. *Circ Res*. **99**:1376-1383.

HANSEN, P.S., CLARKE, R.J., BUHAGIER, K.A., HAMILTON, E., GARCIA, A., WHITE, C., RASMUSSEN, H.H. (2007). Alloxan-induced diabetes reduces sarcolemmal Na^+/K^+ pump function in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. **292**:C1070-C1077.

- HARRISON, S.M., FRAMPTON, J.E., McCALL, E., BOYETT, M.R., ORCHARD, C.H. (1992). Contraction and intracellular Ca^{2+} , Na^+ and H^+ during acidosis in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol.* **262**:C348-C357.
- HATTORI Y., MATSUDA Y., KIMURA J., ISHITANI T., TAMADA A., GANDO S., KEMMOTSU O., KANO M. (2000). Diminished function and expression of the cardiac Na^+ - Ca^{2+} exchanger in diabetic rats: implication in Ca^{2+} overload. *J Physiol* **527**:85-94.
- HE, Z., FENG, S., HILGEMANN, D.W., PHILIPSON, K.D. (2000). Interaction of PIP(2) with the XIP region of the cardiac Na/Ca exchanger. *Am J Physiol Cell Physiol.* **278(4)**:C661-C666.
- HILGEMANN, D.W., COLLINS, A., MATSUOKA, S. (1992). Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Secondary modulation by cytoplasmic calcium and ATP. *J Gen Physiol.* **100**:933-961.
- HONGO, K., WHITE, E., LE GUENNEC, J.Y. ORCHARD, C.H. (1996). Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Na}^+]_i$ and Ca^{2+} current in isolated rat ventricular myocytes following an increase in cell length. *J Physiol.* **491(3)**:609-619.
- HOVE, M., JANSEN, M.A., NEDERHOFF, M.G., VAN ECHELD, C.J. (2007). Combined blockade of the Na^+ channel and the Na^+/H^+ exchanger virtually prevents ischemic Na^+ overload in rat hearts. *Mol Cell Biochem.* **297(1-2)**:101-110.
- IWAMOTO, T., PAN, Y., NAKAMURA, T.Y., WAKABAYASHI, S., SHIGEKAWA, M. (1998). Protein kinase C-dependent regulation of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger isoforms NCX1 and NCX3 does not require their direct phosphorylation. *Biochemistry.* **37**:17230-17238.
- JANDELEIT-DAHM, K., HANNAN, K.M., FARRELLY, C.A. ET AL. (2000). Diabetes-induced vascular hypertrophy is accompanied by activation of Na^+/H^+ exchange and prevented by Na^+/H^+ exchange inhibition. *Circ Res.* **87**:1133-1140.
- JANVIER, N.C., BOYETT, M.R. (1996). The role of Na-Ca exchange current in the cardiac action potential. *Cardiovasc. Res.* **32**: 69-84.

- JOHNSON, A.B., TAYLOR, R. (1990). Diabetes mellitus. *Postgrad Med J.* **66**:1010-1024.
- JOURDON, P., FEYVRAY, D. (1993). Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *J Physiol.* **470**:411-429.
- KARASU, C., OZTURK, Y., ALTAN, N., YILDIZOGLU-ARI, N., IKIZLER, C., ALTAN, VM. (1990). Thyroid hormones mediated effect of insulin on alloxan diabetic rat atria. *Gen Pharmacol.* **21(5)**:735-40.
- KARMAZYN, M., GAN, X.T., HUMPHREYS, R.A., YOSHIDA, H., KUSUMOTO, K. (1999). The myocardial Na⁺-H⁺ exchange structure, regulation and role in heart disease. *Circ Res.* **85**:777-786.
- KATZ, A.M. (1992). Physiology of the heart. *Raven Press.*
- KAUMANN, A.J. (1997). Four beta-adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. *Trends Pharmacol Sci.* **18(3)**:70-6.
- KOFUJI, P., HADLEY, R.W., KIEVAL, R.S., LEDERER, W.J., SCHULZE, D.H. (1992). Expression of the Na-Ca exchanger in diverse tissues: a study using the cloned human cardiac Na-Ca exchanger. *Am J Physiol.* **263**:C1241-C1249.
- KOMUKAI, K., PASCAREL, C., ORCHARD, C.H. (2001). Compensatory role of CaMKII on I_{Ca} and SR function during acidosis in rat ventricular myocytes. *Pflugers Arch.* **442(3)**:353-61.
- KUMAR, S., LIANG, F., LAWRENCE, D.S., ZHANG, Z.Y. (2005). Small molecule approach to studying protein tyrosine phosphatase. *Methods.* **35(1)**:9-21.
- LAGADIC-GOSSMANN, D., CHESNAIS, J.M., FEUVRAY, D. (1988). Intracellular pH regulation in papillary muscle cells from streptozotocin diabetic rats: an ion-sensitive microelectrode study. *Pflügers Arch.* **412**:613-617.
- LAGADIC-GOSSMANN, D., BUCKLER, K.J., VAUGHAN-JONES, RD. (1992). Role of bicarbonate in pH recovery from intracellular acidosis in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol.* **458**:361-84.

- LAKATTA, E.G. (1992). Length modulation of muscle performance. Frank-Starling law of the heart. In the heart and cardiovascular system. (2nd ed). *Raven, New York*. 1325-1351.
- LEEM, C.H., LAGADIC-GOSSMANN, D., VAUGHAN-JONES, R.D. (1999). Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol*. **517**:159-80.
- LE PRIGENT, K., LAGADIC-GOSSMANN, D., FEUVRAY, D. (1997). Modulation by extracellular pH and intracellular calcium of Na⁺/H⁺ exchange in diabetic rat isolated ventricular myocytes. *Circ Res*. **80**:253-260.
- LE ROITH, D. (1997). Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center: insulin-like growth factors. *N Engl J Med*. **336**:633-640.
- LIPP, P., LAINE, M., TOVEY, S.C., BURRELL, K.M., BERRIDGE, M.J., LI, W., BOOTMAN, M.D. (2000). Functional InsP₃ receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Curr. Biol.* **10**: 939-942.
- LITWIN, S.E., RAYA, T.E., ANDERSON, P.G., DAUGHERTY, S., GOLDMAN, S. (1990). Abnormal cardiac function in the streptozotocin-diabetic rat: changes in active and passive properties of the left ventricle. *J Clin Invest*. **86**(2):481-488.
- LITWIN, S.E., LI, J., BRIDGE, J.H. (1998). Na-Ca exchange and the trigger for sarcoplasmic reticulum Ca release: Studies in adult rabbit ventricular myocytes. *Biophys J*. **75**:359-371.
- LIU, H., CALA, P.M., ANDERSON, S.E. (2010). Na/H Exchange inhibition protects newborn heart from ischemia/reperfusion injury by limiting Na⁺-dependent Ca²⁺ overload. *J Cardiovasc Pharmacol*. **55**(3):227-233.
- LONDON, B., KRUEGER, J.W. (1986). Contraction in voltage-clamped internally perfused single heart cells. *J Gen Physiol*. **88**:475-505.

- LOPASCHUK, G.D., TAHILIANI, A.G., VADLAMUDI, R.V.S.V., KATZ S., McNEILL J.H. (1983). Cardiac sarcoplasmic reticulum function in insulin or carnitine created diabetic rats. *Am. J. Physiol.*, **245**:H969-H976.
- MAACK C., CORTASSA S., AON M.A., GANESAN A.N., LIU T., O'ROURKE B. (2006). Elevated cytosolic Na⁺ decreases mitochondrial Ca²⁺ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circ Res* **99**:172-182.
- MACLENNAN, D.H., ABU-ABED, M., KANG, C. (2002). Structure-function relationships in Ca²⁺ cycling proteins. *J Mol Cell Cardiol.* **34**:897-918.
- MADSHUS, I.H. (1988). Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells. *Biochem J.* **250**:1-8.
- MAGYAR, J., RUSZNAK, Z., SZENTESI, P., SZUCS, G., KOVACS, L. (1992). Action potentials and potassium currents in rat ventricular muscle during experimental diabetes. *J Mol Cell Cardiol.* **24**:841-853.
- MAIER, L.S., BERS, D.M., PIESKE, B. (2000). Differences in Ca²⁺ -handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ -content in isolated rat and rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* **32**:2249-2258.
- MAKINO N., DHALLA K.S., ELIMRAN V., & DHALLA N.S. (1987). Sarcolemmal Ca²⁺-transport in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy in rats. *Am J Physiol* **253**:E202-207.
- MANDEL, F., KRANIAS, E.G., GRASSI D.E GENDE, A., SUMIDA, M., SCHWARTZ, A. (1982). The effect of pH on the transient-state kinetics of Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. A comparison with skeletal sarcoplasmic reticulum. *Circ Res.* **50(2)**:310-7.
- MARKS, A.R. (2000). Cardiac intracellular calcium release channels: role in heart failure. *Circ Res.* **87**:8-11.

- MATSUOKA, S., NICOLL, D.A., HRYSHKO, L.V., LEVITSKY, D.O., WEISS, J.N., PHILIPSON, K.D. (1995). Regulation of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger by Ca²⁺. Mutational analysis of the Ca²⁺-binding domain. *J Gen Physiol.* **105(3)**:403-20.
- MATSUOKA, S., NICOLL, D.A., ZHAOPING, H., PHILIPSON, K.D. (1997). Regulation of cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger by the endogenous XIP region. *J Gen Physiol.* **109(2)**:273-86.
- MILLS G.D., HARRIS D.M., CHEN X., HOUSER S.R. (2007). Intracellular sodium determines frequency dependent alterations in contractility in hypertrophied feline ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**:H1129-H1138.
- MIURA, Y., KIMURA, J. (1989). Sodium-calcium exchange current. Dependence on internal Ca and Na and competitive binding of external Na and Ca. *J Gen Physiol.* **93**:1129-1145.
- MORAD, M., GOLDMAN, Y. (1973). Excitation-contraction coupling in heart muscle: membrane control of development of tension. *Prog Biophys Mol Biol.* **27**:257-313.
- MORAD, M., CLEEMAN, L. (1987). Role of Ca²⁺ channel in development of tension in heart muscle. *J Mol Cell Cardiol.* **27**:257-313.
- MORGAN, J.P., ERNY, R.E., ALLEN, P.D., GROSSMAN, W., GWATHMEY, J.K. (1990). Abnormal intracellular calcium handling, a major cause of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure. *Circulation.* **81**:III-21-III-32.
- MURPHY, E., PERLMAN, M., LONDON, R.E., STEENBERGEN, C. (1991). Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ Res.* **68**:1250-1258.
- MURPHY E., CROSS H., STEENBERGEN C. (1999). Sodium regulation during ischemia versus reperfusion and its role in injury. *Circ. Res.* **84**:1469–1470.
- NATTEL, S., CARLSSON, L. (2006). Innovative approaches to anti-arrhythmic drug therapy. *Nat Rev Drug Discov.* **5**:1034-1049.

- NEWSHOLME, E.A., DIMITRIADIS, G. (2001). Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. **109**:S122-S134.
- NICOLL, D.A., LONGONI, S., PHILIPSON, K.D. (1990). Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *Science*. **250**:562-565.
- NICOLL, D.A., HRYSHKO, L.V., MATSUOKA, S. ET AL. (1996). Mutation of amino acid residues in the putative transmembrane segments of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem*. **271**:13385-13391.
- NICOLL, D.A., OTTOLIA, M., LU, L., LU, Y., PHILIPSON, K.D. (1999). A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem*. **274**(2):910-7.
- NOBE S., ANOMINE M., ARITA M., ITO S & TAKAKI R. (1990). Chronic diabetes mellitus prolongs action potential duration of rat ventricular muscles: circumstantial evidence for impaired Ca²⁺ channel. *Cardiovasc Res* **24**:381-389.
- NORBY, F.L., WOLD, L.E., DUAN, J., HINTZ, K.K., REN, J. (2002). IGF-I attenuates diabetes-induced cardiac contractile dysfunction in ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. **283**: E658-666.
- NYGREN, A., OLSON, M.L., CHEN, K.Y., EMMETT, T., KARGACIN, G., SHIMONI, Y. (2007). Propagation of the cardiac impulse in the diabetic rat heart: reduced conduction reserve. *J Physiol*. **580**(2):543-560.
- ORCHARD, C.H., KENTISH, J.C. (1990). Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. *Am J Physiol*. **258**:C967-981.
- ORLOWSKI, J., GRINSTEIN, S. (1997). Na⁺/H⁺ exchangers of mammalian cells. *J Biol Chem*. **272**:22373-22376.
- OZDEMIR, S., UGUR, M., GURDAL, H., TURAN, B. (2005). Treatment with AT(1) receptor blocker restores diabetes-induced alterations in intracellular Ca(2+) transients and contractile function of rat myocardium. *Arch Biochem Biophys*. **435**(1):166-74.

- OZTURK, Y., ALTAN, V.M., YILDIZOGLU-ARI N. (1996). Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol. Rev.* **48(1)**: 69-112.
- PARK, C.O., XIAO, X.H., ALLEN, D.G. (1999). Changes in intracellular sodium and pH in the rat heart during ischemia: role of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Am J Physiol.* **276**:H1581-H1590.
- PENPARGKUL, S., SCHAIBLE, T., YIPINTSOI, T., SCHEUER, J. (1980). The effect of diabetes on performance and metabolism of rat hearts. *Circ Res.* **47**:911-921.
- PENPARGKUL, S., FEIN, F.S., SONNENBLICK, E.H., SCHEUER, J. (1981). Depressed cardiac sarcoplasmic reticular function from diabetic rats. *J. Moll. Cell. Cardiol.* **13**:303-309.
- PETRECCA, K., ATANASIU, R., GRINSTEIN, S., ORLOWSKI, J., SHRIER, A. (1999). Subcellular localization of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 in rat myocardium. *Am J Physiol.* **276**:H709-H717.
- PHILIPSON, K.D., BERSOHN, M.M., NISHIMOTO, A.Y. (1982). Effects of pH on Na⁺-Ca²⁺ exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles. *Circ Res.* **50(2)**:287-93.
- PHILIPSON, K.D., NICOLL, D.A., OTTOLIA, M., QUEDNAU, B.D., REUTER, H., JOHN, S., QIU, Z. (2002). The Na⁺/Ca²⁺ exchange molecule an overview. *Ann N Y Acad Sci.* **976**:1-10.
- PIERCE, G.N., DHALLA, N. S. (1983). Sarcolemmal Na⁺-K⁺-ATPase activity in diabetic rat heart. *Am. J. Physiol* **245**:C241-247.
- PIERCE, G.N., RUSSELL, J.C. (1997). Regulation of intracellular Ca²⁺ in the heart during diabetes. *Cardiovasc. Res.* **34**: 41-47.
- PIESKE, B., KRETSCHMANN, B., MEYER, M., HOLUBARSCH, C., WEIRICH, J., POSIVAL, H., MINAMI, K., JUST, H., HASENFUSS, G. (1995). Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation.* **92**:1169-1178.

- POOLE, R.C., HALESTRAP, A.P., PRICE, S.J., LEVI, A.J. (1989). The kinetics of transport of lactate and pyruvate into isolated cardiac myocytes from guinea pig. Kinetic evidence for the presence of a carrier distinct from that in erythrocytes and hepatocytes. *Biochem J.* **264**:409-18.
- PORTE, D., HALTER, J.B. (1981). The endocrine pancreas and diabetes mellitus. In: Textbook of endocrinology, Ed: Williams, R.H., Philadelphia p: 715-717.
- PULINA, M.V., RIZZUTO, R., BRINI, M., CARAFOLI, E. (2006). Inhibitory interaction of the plasma membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers with the 14-3-3 proteins. *J Biol Chem.* **281**(28):19645-19654.
- QUEDNAU, B.D., NICOLL, D.A., PHILIPSON, K.D. (1997). Tissue specificity and alternative splicing of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger isoforms NCX1, NCX2 and NCX3 in rat. *Am J Physiol.* **272**:C1250-C1261.
- QUEDNAU, B.D., NICOLL, D.A., PHILIPSON, K.D. (2004). The sodium/calcium exchanger family-SLC8. *Pflugers Arch.* **447**(5):543-8.
- RAEV, D.C. (1994). Which left ventricular function is impaired earlier in the evolution of diabetic cardiomyopathy. *J. Diabetes Care*, **17**:633-539.
- RAMANADHAM, S., TENNER, T. E. (1987). Alterations in the myocardial beta adrenoceptor system of STZ diabetic rats. *Eur. J Pharmacol.* . **136**:377-389.
- RAYMENT, I., HOLDEN, H.M., WHITTAKER, M., YOHAN, C.B., LORENZ, M., HOLMES, K.C., MILLIGAN, R.A. (1993). Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* **261**: 58-65.
- ROSSING, P., BREUM, L., MAJOR-PEDERSEN, A., SATO, A., WINDING, H., PIETERSEN, A., KASTRUP, J., PARYING, H.H. (2001). Prolonged QT_c interval predicts mortality in patients with type 1 diabetes mellitus. *Diab Med.* **18**:199-205.
- RUBLER S, DLUGASH J, YUCEOGLU Y.Z, KUMRAL T, BRANWOOD A.W., GRISHMAN A. (1972) New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol.* **30**(6):595-602.

- SANTACRUZ-TOLOZA, I., OTTOLIA, M., NICOLL D.A., PHILIPSON, K.D. (2000). Functional analysis of a disulfide bond in the cardiac Na(+)-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem.* **275**(1):182-188.
- SATOH, H., HAYASHI, H., KATOH, H., TERADA, H., KOBAYASHI, A. (1995). Na⁺/H⁺ and Na⁺/Ca²⁺ exchange in regulation of [Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i during metabolic inhibition. *Am J Physiol.* **268**:H1239-H1248.
- SATOH, H., MUKAI, M., URUSHIDA, T., KATOH, H., TERADA, H., HAYASHI, H. (2003). Importance of Ca²⁺ influx by Na⁺/Ca²⁺ exchange under normal and sodium-loaded conditions in mammalian ventricles. *Mol Cell Biochem.* **242**:11-17.
- SCAMPS F., VASSORT G. (1994). Effect of extracellular ATP on the Na⁺ current in rat ventricular myocytes. *Circ Res.* **74**:710-717.
- SCHAFFER, S.W., BALLARD-CROFT, C., BOERTH, S., ALLO, S.N. (1997). Mechanisms underlying depressed Na⁺/Ca²⁺ exchanger activity in the diabetic heart. *Cardiov Res* **34**:129-136.
- SCHOUTEN, V.J.A. (1986). The negative correlation between action potential duration and force of contraction during restitution in rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* **18**:1033-1045.
- SCHWARZ, E.M., BENZER, S. (1997). Calx, a Na-Ca exchanger gene of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**:10249-10254.
- SCHWINGER R.H., WANG J., FRANK K. (1999). Reduced sodium pump α_1 , α_3 , and β_1 -isoform protein levels and Na⁺/K⁺-ATPase activity but unchanged Na⁺-Ca²⁺ exchanger protein levels in human heart failure. *Circulation* **99**:2105-2112.
- SEMB, S.O., LUNDE, P.K., HOLT, E., TONNESSEN, T., CHRISTENSEN, G., SEJERSTED, O.M. (1998). Reduced myocardial Na⁺, K⁺-pump capacity in congestive heart failure following myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol.* **30**:1311-1328.

- SETHI, R., DHALLA, K.S., BEAMISH, R.E., DHALLA, N.S. (1997). Differential changes in left and right ventricular adenylyl cyclase activities in congestive heart failure. *Am. J. Physiol.* **272**: H884-H893.
- SEVERSON, D.L., AASUM, E., BELKE, D.D., LARSEN, T.S., SEMENIUK, L.M., SHIMONI, Y. (2003). Diabetes and cardiac dysfunction. In atherosclerosis, hypertension and diabetes. *Kluwer Academic Publishers*. Boston, USA.
- SHAM, J.S.K., CLEEMANN, L., MORAD, M. (1995). Functional coupling Ca^{2+} channels and ryanodin receptors in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**:121-125.
- SHAM, J.S.K., HATEM, S.N., MORAD, M. (1995). Species differences in the activity of the Na^{+} - Ca^{2+} exchanger in mammalian cardiac myocytes. *J Physiol (Lond).* **488**:623-631.
- SHEN, A.C., JENNINGS, R.B. (1972). Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am J Pathol.* **67**:417-440.
- SHERMAN, S.J., CHRIVIA, J., CATTERALL, W.A. (1985). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and cytosolic calcium exert opposing effects on biosynthesis of tetrodotoxin-sensitive sodium channels in rat muscle cells. *J Neuroscience.* **5**:1570-1576.
- SHIMONI, Y., FIREK, L., SEVERSON, D., GILES, W. (1994). Short-term diabetes alters K^{+} currents in rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* **74**: 620-628.
- SHIMONI, Y., EWART, H.S., SEVERSEN, D. (1998). Type I and II models of diabetes produce different modifications of K^{+} currents in rat heart: role of insulin. *J Physiol.* **505**:485-496.
- SOBIE E.A., CANNELL M.B., BRIDGE J.H.B. Allosteric activation of Na^{+}/Ca^{2+} Exchange by L-type Ca^{2+} current augments the trigger flux for SR Ca^{2+} release in ventricular myocytes. *Biophys J Biophys Lett* 2008.

- STEENBERGEN, C., DELEEUW, G., RICH, T., WILLIAMSON, J.R. (1977). Effects of acidosis and ischemia on contractility and intracellular pH of rat heart. *Circ Res* **41(6)**:849-58.
- STRYER, L. (2002). Fatty acid metabolism, and protein turnover and amino acid catabolism. In: Stryer, L., editor. *Biochemistry*. Freeman W.H., and Co.
- SUGISHITA K., SU Z., LI F., PHILIPSON K.D., BARRY W.H. (2001). Gender influences $[Ca^{2+}]_i$ during metabolic inhibition in myocytes overexpressing the Na^+-Ca^{2+} exchanger. *Circ.* **104**:2101-2106.
- SWIFT, F., TOVSRUD, N., ENGER, U.H., SJAASTAD, I., SEJERSTED, O.M. (2007). The Na^+/K^+ -ATPase α_2 -isoform regulates cardiac contractility in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* **75**:109-117.
- SZEBENI, A., FALUS, A., KECSKEMETI, V. (2009). Electrophysiological characteristics of heart ventricular papillary muscles in diabetic histidine decarboxylase knockout and wild-type mice. *J Interv Card Electrophysiol.* **26**:155-158.
- TANI, M., NEELY, J.R. (1989). Role of intracellular Na^+ and Ca^{2+} overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H^+-Na^+ and Na^+-Ca^{2+} Exchange. *Circ Res.* **65**:1045-1056.
- TAYLOR, R., VANDERPUMP, M. (1994). New concepts in diabetes mellitus I: treatment, pregnancy and aetiology. *Postgrad Med J.* **70**:418-427.
- TESHIMA, Y., TAKAHASHI, N., SAIKAWA, T., HARA, M., YASUNAGA, S., HIDAKA, S., SAKATA, T. (2000). Diminished expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and ryanodine sensitive Ca^{2+} channel mRNA in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**: 655-664.
- TOMLINSON, K.C., GARDINER, S.M., HEBDEN, R.A., BENNETT, T. (1992). Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol. Rev.* **44**: 103-150.

- TROCHU, J.N., LEBLAIS, V., RAUTUREAU, Y., BEVERELLI, F., MAREC, H L , BERDEAUX, A., GAUTHIER, C. (1999). Beta3-AR Stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol.*, **128**:69-76.
- TSUCHIDA, K., WATAJIMA, H., OTOMO, S. (1994). Calcium current in rat diabetic ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* **267** (*Heart Circ. Physiol.* **36**: H2280-H2289.
- UUSITTUPA, M I., MUSTONEN, J.N., AIRAKSINEN, K.E. (1990). Diabetic heart muscle disease. *J. Ann. Med.*, **22**:377-386.
- VAUGHAN-JONES, R.D. (1988). Regulation of intracellular pH in cardiac muscle. *Ciba Found Symp.* **139**:23-46.
- VAUGHAN-JONES, R.D., WU, M-L. (1990). Intracellular intrinsic buffering power varies with pH_i in the sheep cardiac purkinje fibre. *J Physiol (Lond)*. **425**:429-448.
- VAUGHAN-JONES, R.D., SPITZER, K.W., SWIETACH, P. (2006). Spatial aspects of intracellular pH regulation in heart muscle. *Prog Biophys Mol Biol.* **90**:207-224.
- VAUGHAN-JONES, R.D., SPITZER, K.W., SWIETACH, P. (2009). Intracellular pH regulation in heart. *J Mol Cell Cardiol.* **46**:318-331.
- VANDENBERG, J.I., METCALFE, J.C., GRACE, A.A. (1993). Mechanisms of pH_i recovery after global ischemia in the perfused heart. *Circ Res.* **72**:993-1003.
- VASSORT, G., TALAVERA, K., ALVAREZ, J.L. (2006). Role of T-type Ca²⁺ channels in the heart. *Cell Calcium.* **40**:205-220.
- VER A., SZANTO L., BANYASZ T., CSERMELY.P., VEGH E., SOMOGYI J. (1997). Changes in the expression of Na⁺/K⁺ ATPase isoenzymes in the left ventricle of diabetic rat hearts:effect of insulin treatment. *Diabetologia* **40**:1255-1262.
- VERDONCK F., VOLDERS P.G.A., VOS M.A., SIPIDO K.R. (2003). Increased sodium concentration and altered Na/K pump activity in hypertrophied canine ventricular cells. *Cardiovasc Res.* **57**:1035-1043.

- VIAL, G., DUBOCHAUD, H., COUTURIER, K., LANSON, M., LEVERVE, X., DEMAISON, L. (2008). Na⁺/H⁺ Exchange inhibition with cariporide prevents alterations of coronary endothelial function in streptozotocin-induced diabetes. *Mol Cell Biochem.* **310**:93-102.
- VIZGIRDA, V.M., WAHLER, G.M., SONDEGROTH, K.L., ZIOLO, M.T., SCHWERTZ, D.W. (2002). Mechanisms of sex differences in rat cardiac myocyte response to beta-adrenergic stimulation. *Am. J.Physiol.Heart. Circ. Physiol.* **282(1)**: H256-63.
- VON BOEHMER, H. (2004). Type 1 diabetes: focus on prevention. *Nature Med.* **10(8)**:782-784.
- WAKABAYASHI, S., SHIGEKAWA, M., POUYSSEGUR, J. (1997). Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol Rev.* **77**:51-74.
- WARD, C.W., LAWRENCE, M.C. (2009). Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor. *Bioessays* **31 (4)**: 422–434.
- WATANABE Y., KOIDE Y., KIMURA J. Topics on the Na⁺/Ca²⁺ exchanger : pharmacological characterization of Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitors. *J Pharmacol* 2006;**102**:7-16.
- WEIR. G. (1982). Non-insulin dependent diabetes mellitus interplay between beta-cell inadequacy and insulin resistance. *Am. J. Med.*, **73**: 461-467.
- WIER, W.G. (1990). Dynamics of control of cytosolic calcium ion concentration. *Ann Rev Physiol.* **52**:467-485.
- WILLIAMS, I.A., XIAO, X-H., JU, Y-K., ALLEN, D.G. (2007). The rise of [Na⁺]_i during ischemia and reperfusion in the rat heart-underlying mechanisms. *Pflügers Arch.* **454(6)**:903-12.
- WOHLFART, B. (1979). Relationship between peak force, action potential duration and stimulus interval in rabbit myocardium. *Acta Physiol Scand.* **106**:395-409.

- WOOD, E.H., HEPPNER, R., WEIDMANN, S. (1969). Inotropic effects of electric currents. *Circ Res.* **24**:409-445.
- XIAO, X.H., ALLEN, D.G. (1999). Role of the Na^+/H^+ exchanger during ischemia and preconditioning in the isolated rat heart. *Circ Res.* **85**:723-730.
- XU, P., SPITZER, K.W. (1994). Na-independent $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange mediates recovery of pH_i from alkalosis in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol.* **267**:H85-91.
- XU, Z., PATEL, K.P., LOU, M.F., ROZANSKI, G.J. (2002). Up-regulation of K^+ channels in diabetic rat ventricular myocytes by insulin and glutathione. *Cardiovasc Res.* **53**:80-88.
- YAMAMOTO, T., SWIETACH, P., ROSSINI, A., LOH, S.H., VAUGHAN-JONES, R.D., SPITZER, K.W. (2005). Functional diversity of electrogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport in ventricular myocytes from rat, rabbit and guinea pig. *J Physiol.* **562**:455-75.
- YARAS, N., UGUR, M., OZDEMIR, S., GURDAL, H., PURALI, N., LACAMPAGNE, A., VASSORT, G., TURAN, B. (2005). Effects of diabetes on ryanodine receptor Ca release channel (RyR2) and Ca^{2+} homeostasis in rat heart. *Diabetes* **54**(11):3082-8.
- YARAS, N., TUNCAY, E., PURALI, N., SAHINOGLU, B., VASSORT, G., TURAN, B. (2007). Sex-related effects on diabetes-induced alterations in calcium release in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **293**(6):H3584-H3592.
- YARAS, N., SARIAHMETOGLU, M., BILGINOGLU, A., AYDEMIR-KOKSOY, A., ONAY-BESIKCI, A., TURAN, B., SCHULZ, R. (2008). Protective action of doxycycline against diabetic cardiomyopathy in rats. *Br J Pharmacol.* **155**(8):1174-1184.
- YEUNG H.M., KRAVTSOV G.M., NG K.M., WONG T.M., FUNG M.L. (2007). Chronic intermittent hypoxia alters Ca^{2+} handling in rat cardiomyocytes by augmented $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange and ryanodin receptor activities in ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Cell Physiol.* **292**:C2046-C2056.

- YU, F.H., CATTERALL, W.A. (2003). Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* **4(3)**:207.1-207.7.
- YU, Z., McNEILL, J.H. (1991). Altered inotropic responses in diabetic cardiomyopathy and hypertensive-diabetic cardiomyopathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **257**:64-71.
- ZERKOWSKI, H.R., IKEZONO, K., ROHM, N., REIDEMEISTER, J.C., BRODDE, O.R. (1986). Human myocardial beta-ARs: Demonstration of both beta1 and beta2- ARs mediating contractile responses to beta- agonists on the isolated right atrium. *Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **332**:142-147.

ÖZGEÇMİŞ

I- BİREYSEL BİLGİLER

Adı:	Ayça
Soyadı:	BİLGİNOĞLU
Doğum yeri ve tarihi:	Erzurum/15.09.1979
Uyruğu:	T.C.
Medeni durumu:	Bekar
İletişim adresi ve telefonu:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik A.B.D.–0312 3103010/337

II- EĞİTİMİ

- Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Ab.D. Doktora (2005-2010)
- Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Ab.D. Yüksek Lisans (2003-2005)
- Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (1999-2003)
- Fatih Sultan Mehmet Lisesi (Yabancı Dil Eğitimi) (1993-1997)
- Hüseyin Güllüoğlu Ortaokulu (1990-1993)
- Çizmeci İlkokulu (1985-1990)
- Yabancı dili: İngilizce

III- MESLEKİ DENEYİMİ

- Araştırma Görevlisi: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Ab.D.
(2005-...)

IV- BİLİMSEL İLGI ALANLARI

Yayımları:

- 1) **Zeydanli E.N., Bilginoglu A., Tanriverdi E., Gurdal H., Turan B.** Selenium restores defective beta-adrenergic receptor response of thoracic aorta in diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 2010. 338(1-2):191-201.
- 2) **Aydemir-Koksoy A., Bilginoglu A., Sariahmetoglu M., Schulz R., Turan B.** Antioxidant treatment protects diabetic rats from cardiac dysfunction by preserving contractile protein targets of oxidative stress. *J Nutr Biochem.* 2010. 21:827-833.
- 3) **Bilginoglu A., Seymen A., Tuncay E., Zeydanli E., Aydemir-Koksoy A., Turan B.** Antioxidants but not doxycycline treatments restore depressed beta-adrenergic responses of the heart in diabetic rats. *Cardiovasc Toxicol.* 2009, 9(1):21-29.
- 4) **Yaras N., Sariahmetoglu M., Bilginoglu A., Aydemir-Koksoy A., Onay-Besikci A., Turan B., Schulz R.** Protective action of doxycycline against diabetic cardiomyopathy in rats. *Br J Pharmacol.* 2008, 155(8):1174-1184.
- 5) **Bilginoglu A., Cicek FA., Ugur M., Gurdal H., Turan B.** The role of gender differences in beta-adrenergic receptor responsiveness of diabetic rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2007, 305(1-2):63-69.
- 6) **Yaras N., Bilginoglu A., Vassort G., Turan B.** Restoration of diabetes-induced abnormal local Ca^{2+} release in cardiomyocytes by angiotensin II receptor blockade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007, 292(2):H912-H920.

Seçili Bildiriler:

- 1) **Bilginoglu A., Zeydanli EN., Tuncay E., Seymen A., Turan B.** Cardiac ryanodin receptors: a novel therapeutic target in diabetic cardiomyopathy. *The 2009 ACR/ARHP Annual Scientific Meeting.* October 12-21, 2009, Philadelphia, Pennsylvania.
- 2) **Zeydanli EN., Bilginoglu A., Tuncay E., Seymen A., Turan B.** Zinc release modulates cardiac ryanodine receptors. *FEPS 2009.* November 12-15, 2009, Ljubljana, Slovenia.
- 3) **Bilginoglu A., Seymen A., Tuncay E., Koksoy A., Turan B.** Antioxidants but not doxycycline restore depress beta-adrenergic responses of the heart in diabetic rats. *XXVIII. European Section of ISHR Congress.* 28-31 May 2008. Athens, Greece.
- 4) **Zeydanli EN., Bilginoglu A., Koksoy A., Turan B.** Roles of oxidant stress and matrix metalloproteinases in endothelium- dependent relaxation of diabetic rat thoracic aorta. *XXVIII. European Section of ISHR Congress.* 28-31 May 2008. Athens, Greece.

- 5) **Bilginoglu A., Turan B.** Doksisisiklinin ve antioksidanların diyabetik rat modelinde kalp β -adrenerjik reseptör yanıtlarına etkisi. Poster sunumu 22-25 Ekim 2008 *Türk Biyofizik Kongresi*. Mersin, Türkiye.
- 6) **Koksoy A., Zeydanli EN., Bilginoglu A., Gurdal H., Schulz R., Turan B.** Matrix metalloproteinases contribute to diabetes induced cardiovascular dysfunction. *Nato Advanced Research Workshop*. May 12-16, 2008, Istanbul, Turkey.
- 7) **Bilginoglu A., Amber F., Ugur M., Gurdal H., Turan B.** Role of sex differences in β -adrenergic receptor responsiveness of diabetic rat heart. *XIX. ISHR World Congress*. 22-26 June 2007. Bologna-Italy. Poster Presentation.
- 8) **Sariahmetoglu M., Koksoy A., Bilginoglu A., Besikci A., Turan B., Shulz R.** Inhibition of matrix metalloproteinases reduces streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *XIX. ISHR World Congress*. 22-26 June 2007. Bologna, Italy.
- 9) **Turan B., Yaras N., Bilginoglu A., Amber F., Ugur M.** Sex difference affects Ca^{2+} sparks parameters and β -adrenergic receptor responses in rat heart. 50 th Annual Meeting of American Biophysical Society, Feb. 18-22, 2006, Salt Lake, USA.
- 10) **Bilginoglu A., Ozdemir S., Yaras N., Ugur M., Turan B.** β -adrenergic receptor responses in diabetic rat hearts: effect of sex differences. *Nato Advanced Research Workshop*, 2-7 February 2005, Antalya, Turkey.

V- BİLİMSEL ETKİNLİKLERİ

Projeler

Kardiyomiyositlerde Beta-Adrenerjik Reseptör Yanıtları.

(Yardımcı Araştırmacı)

TÜBİTAK/2004-2006

Kardiyomiyositlerde Çinko İyon Dengesi.

(Yardımcı Araştırmacı)

TÜBİTAK/2007-2010

Kardiyomiyositlerde Sodyum ve Hidrojen Homeostazının İncelenmesi.

(Yardımcı Araştırmacı)

BAP/2009-2012

Verdiği Seminerler:

Diyabetik Kardiyomiyositlerde Beta-Adrenerjik Reseptör Yanıtları.

TRP Kanallarının Özellikleri ve Regülasyonu.

Titin Proteinin Yapısı, Özellikleri ile Kalp Kasındaki Aktif ve Pasif Gerim
Üzerine Etkisi

V- DİĞER BİLGİLER

ERASMUS Programı ile Yardımcı Araştırmacı-Kuopio Üniversitesi, Finlandiya
(20007-Yaz Dönemi).