

Pioglitazonun Metabolik Sendromlu Sıçan Kalp Fonksiyonuna Etkisinin Elektrofizyolojik Yöntemlerle İncelenmesi*

An Investigation on Effects of Pioglitazone in the Heart Function from Rats with Metabolic Syndrome by Using Electrophysiological Techniques

Ayşegül Toy¹, Makbule Fulya Tutar¹, Yusuf Olgar¹, Esmâ Nur Okatan¹, Sinan Değirmenci¹, Seyfullay Aksu², İsmet Aydın², Emrullah Bıçakçı², Muhammet Doğan², Ahmet Gündüz², Erkan Tuncay¹, Belma Turan¹

¹ Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı.

² Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dönem III Öğrencileri.

*Bu çalışmanın finansal desteği, TÜBİTAK SBAG-1135466 no'lu projeden sağlanmıştır.

Amaç: Metabolik sendrom (MetS), genellikle insülin-direnci ile karakterize, kardiyovasküler sistem sorunlarıyla seyreden, mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamış bir hastalıktır. Diğer yandan, MetS-indüklü komplikasyonların tedavisinde kullanılan bazı ilaçların, kardiyovasküler sistem sorunlarına ek sorunlar getirebildiği tartışılmaktadır. Bu çalışmada, ilk olarak insülin-duyarlaştırıcı olarak bilinen pioglitazonun, MetS-indüklü bozulan kalp fonksiyonu üzerindeki etkisini incelemeyi hedefledik. İkinci olarak, MetS-indüklü etkinin artan oksidatif stres üzerinden olup olmadığını göstermek amacıyla, bilinen bir antioksidan (kuersetin) uygulayarak sonuçları karşılaştırmalı olarak incelenmesi hedefledik.

Materyal ve Metodlar: Toplam 28-adet erkek Wistar-türü sıçanlar (3 aylık), kontrol grubu (Kon), MetS grubu (MetS; 18-hafta içme suyuna %32 sükröz eklenerek oluşturulmuştur), MetS-grubunun 16. haftasından itibaren 2-hafta süre ile ya pioglitazon uygulanmış MetS-grubu (Piog; 30 mg/kg/gün), ya da kuersetin uygulanmış MetS grubu (Kuer; 75 mg/kg/gün) olarak düzenlenmiştir. Tüm hayvanlar standart koşullarda normal sıçan yemi ile beslenmiştir. Çalışma sonunda, hayvanların vücut ağırlıkları, kan şekeri ile serum toplam oksidatif stres (TOS) ve antioksidan (TAS) durumları özel kit ile ölçülmüştür. Langendorff-izole-organ-sisteminde sol ventrikül içi basınç değişimleri (SVBD) ile, enzimatik yöntemle kalbin ventrikülünden izole edilen kardiyomyositlerde (Ca²⁺-duyarlı floresan Fura-2AM ile boyanmış) hücre-içi bazal serbest-Ca²⁺ seviyesi ([Ca²⁺]_i) ve elektriksel-uyarı altında (aksiyon-potansiyeli sırasında) geçici [Ca²⁺]_i değişimleri incelenmiştir.

Bulgular ve Sonuç: Pioglitazon veya kuersetin, MetS-grubunda kilo artışı ve yüksek kan şekeri üzerinde pozitif etkiler gösterirken, her iki ajan artmış olan serum TOS seviyelerini değiştirememiş, buna karşılık küçük fakat anlamlı seviyede TAS seviyesinin yükselmesine neden olmuşlardır (p<0,05). Kuersetin, MetS-grubunda baskılanmış olan SVBD'leri etkilemezken, pioglitazon daha da baskılanmasına neden olmuştur. Buna karşılık, MetS-grubunda, artmış olan bazal [Ca²⁺]_i seviyesi ile elektriksel uyarı altında ölçülen geçici [Ca²⁺]_i değişimlerinin her iki ajan uygulaması ile normal seviyelere döndüğü görülmüştür. Her iki uygulamanın hücre düzeyinde özellikle [Ca²⁺]_i değişimlerini benzer şekilde pozitif yönde etkilerken, organ düzeyinde aynı pozitif etkilerin gözlenmemesinin nedeni, bu 2 ajanın MetS-indüklü kalp dokusunda gelişen fibröz oluşumu üzerinde etkili olamamalarından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: Diyabet, Antioksidanlar, Oksidatif Stres, İnsülin-Direnci, Kasılma Kuvveti, Ca²⁺-Homeostazi.

Objective: Metabolic syndrome (MetS), generally characterized with insulin-resistance, leads to

severe cardiovascular disorders, however, the underlying mechanisms of this syndrome has not yet been fully determined. In addition, there are some controversies related with anti-diabetic agents used for treatment of MetS-induced complications, including their aggravating effects on the depressed cardiac function. Therefore, in this study, we first aimed to investigate the effects of pioglitazone, known as an insulin-sensitizer, on MetS-induced heart dysfunction. Second, for a comparative study to determine whether MetS-induced heart dysfunction is due to increased oxidative stress, we used a known antioxidant (quercetin) to MetS rats for the same period.

Material and Methods: Total 28 male Wistar rats (3 months) were grouped as control group, (Con), MetS group (MetS; added 32% sucrose to drinking water for 18-week), MetS group supplemented with pioglitazone (Piog; 30 mg/kg/day via gavage for 2-week, from 16th-week of MetS-group) and MetS with quercetin (Quer; 75 mg/kg/day via gavage for 2-weeks from 16th-week of MetS group). All rats were fed with standard rat-diet and tap water at standard condition. At the end of experimental period, the body weights and blood glucose levels, and total oxidative status (TOS) and total antioxidant status (TAS) in serum by using special kits were measured for all animals. By using Langendorff-isolated-organ system, left ventricle pressure changes (LVPC) were measured in isolated hearts. The basal level of intracellular free Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) and Ca²⁺ transients under electrical-stimulation (under action-potential) were measured in freshly isolated cardiomyocytes by enzymatic-method (loaded with Ca²⁺-sensitive fluorescence dye, Fura-2AM).

Results and Discussion: Either pioglitazone or quercetin application have positive effects on body weight and high blood sugar levels in MetS-group rats. Additionally, both agents caused a small but significant increase on serum TAS levels (p<0.05) while they could not affect the increased serum TOS levels, significantly. Furthermore, quercetin has no significant effect on depressed LVPC levels, while pioglitazone treatment caused even more depression on LVPC levels (p<0.05). Nonetheless, both treatments induced significant protection against MetS-induced alterations in calculated parameters of [Ca²⁺]_i levels and the Ca²⁺ transients obtained under electrical stimulation (p<0.05). Under the light of our data, such as positive effects on cellular level including parameters of [Ca²⁺]_i; changes in isolated cardiomyocytes and no similar positive effects in isolated-organ level, we can assert that these two-agents may have no effects on MetS-induced marked generation of fibrosis in the heart with high sucrose diet in rats.

Key Words: Diabetes, Antioxidants, Oxidative Stress, Insulin-Resistance, Tension, Ca²⁺ - Homeostasis..

Geliş tarihi: 25.06.2015 • Kabul tarihi: 10.08.2015

İletişim

Prof. Dr. Belma Turan
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı
e-posta: belma.turan@medicine.ankara.edu.tr
Tel: +90 312 595 8186
Faks: +90 312 310 6370

Metabolik sendrom (MetS), obezite, hiperinsülinemi, hiperlipidemi ve hipertansiyon ile karakterize, çoğunlukla kardiyovasküler bozukluklar ve insülin direncinin gelişmesine bağlı tip 2 diyabet için ciddi risk faktörü oluşturabilen önemli bir patolojidir (1, 2). Diğer yandan, fiziksel aktivite eksikliği, dengesiz ve aşırı beslenme gibi başlıca nedenler bireylerde insülin direncine yol açarak MetS oluşumuna zemin hazırlayabilmektedir (3). Toplumlardaki görülme sıklığı gün geçtikçe artan MetS'un ülkemizdeki prevalansı, erkeklerde % 24-32, kadınlarda % 39-45 oranındadır (4-8). Deney hayvanlarında MetS genellikle genetik manipülasyon ya da diyet-indüklü olarak oluşturulmaktadır. Fruktozun diyet kaynağı olan sükröz ile besleme, deney hayvanlarında insanda oluşan MetS'a en yakın patolojilerin gözlemlendiği MetS deney modelidir. Sükröz, bozulmuş glukoz toleransı ile beraber plazmada artmış insülin, leptin, trigliserit, glukoz ve yağ asitleri ile MetS oluşumuna yol açmaktadır (9). Diğer yandan, yüksek karbonhidrat-yüksek yağ içeren diyet insan diyetine en yakın diyet modellerden biri olarak gösterilse de, gözlenen patolojilerin mekanistik açıklamalarının yapılması hedeflenen araştırmalar için, diyet heterojenitesi dezavantaj oluşturduğundan bu yolla MetS daha az tercih edilen bir modeldir (9).

Literatür verileri, 3-4 haftalık yüksek sükröz alımının deney hayvanlarında plazma glukoz düzeylerini etkilemezken hiperinsülinemiye neden olduğu, plazma trigliserit ve LDL kolesterol düzeylerinin yükseldiği ve sistemik lipid regülasyonunun bozulduğunu göstermektedir (10-17). Ayrıca bu diyetin hem dişi ve hem de erkek sıçanlarda hipertansiyona neden olduğu rapor edilmiştir (12, 14, 18, 19). Özet olarak, MetS ile ilişkili kalp fonksiyon bozukluğunun altında yatan nedenler arasında, dislipidemi, insülin direnci ve hiperglisemi kardiyomyosit metabolizmasında bozukluk gibi patolojik süreçlerin bulunduğu ve bunla-

rın son etki olarak kalp fonksiyon bozukluğu ya da kalp yetmezliği gelişimine neden olduğu anlaşılmaktadır (20). Kalp yetmezliği durumunda bozulmuş hücre içi Ca^{2+} homeostazının kalp performansını etkilediği de bilinen temel mekanizmalardan biridir.

Diğer yandan, MetS'da kalp fonksiyon bozukluğunun altında yatan mekanizmalar arasında temel olarak mitokondri fonksiyon bozukluğu ile artan oksidatif stres (ve/veya azalan antioksidan savunma mekanizması) gibi faktörlerin bulunduğu da ileri sürülmektedir (20). Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (ROS ve RNS) mitokondri ve ekstrasitoplazmik membran kaynaklı ile azalmış antioksidan savunma sistemi mekanizmaları MetS'lu insan ve hayvanların miyokardiyumunu karakterize eder (21-24). MetS-indüklü komplikasyonların tedavisinde, sıklıkla anti-diyabetik ilaçlar kullanılmasına karşın bazı durumlarda antioksidanlar da tavsiye edilmektedir. Diğer yandan, bazı çalışmalarda anti-diyabetik olarak kullanılan bazı ilaçların diyabetli bireylerde kardiyovasküler sistem sorunlarına ek sorunlar getirebildiğini de işaret etmektedir (25-31). Bu çalışmada, önceki çalışmamızda yüksek sükröz ile beslenerek MetS geliştiği kanıtlanmış ve sol ventrikül kasılma kuvvetinin baskılandığı gösterilmiş olan sıçanlar kullanılmıştır (32). Bu çalışmada ilk hedefimiz, bu hayvanlara insülin-duyarlaştırıcı pioglitazon uygulayarak kalp fonksiyonu üzerindeki etkileri incelemektir. İkinci hedefimiz, MetS-indüklü gelişen kalp fonksiyon bozukluğunun altında yatan nedenler arasında artan oksidatif stres olup olmadığını göstermek olup, ikinci bir grup MetS'lu hayvanlara bilinen bir antioksidan (kuersetin) uygulayarak, sonuçları karşılaştırmalı olarak incelemektir. Bu hedeflere ulaşmak için hem izole kalp ölçümleri ve hem de kalbin ventrikül kısmından taze olarak izole edilen kardiyomyositlerde fonksiyonel çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

MATERYAL ve METODLAR

Sıçanlarda Metabolik Sendrom Oluşturulması

Çalışmamızda kullanılan deney hayvanları için Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay raporu alınmıştır (2012-5-35 ve 2015-10-125). Deneyler için, ağırlıkları 200-250 g arasında değişen, yaklaşık 3-aylık, Wistar türü erkek sıçanlar kullanılmıştır. Bu çalışmada dört farklı deney grubu kullanılmıştır: Kontrol grubu (Kontrol grubu; normal diyet, standart sıçan yemi ve içme suyu ile beslenen sıçanlar, 18-hafta), metabolik sendrom grubu (MetS-grubu; normal diyetlerine ek olarak içme suyuna karıştırılan 935 mM, %32 sükröz ilave edilmiş su ile 18-hafta beslenen grup; (29)), MetS-gruba son 2-hafta süre ile pioglitazon verilen grup (Piog-grubu; 30 mg/kg/gün, gavaj yoluyla) ve yine MetS-gruba son 2-hafta süre ile kuersetin (Kuer-grubu; 75 mg/kg/gün, gavaj yoluyla) verilen grup. Tüm hayvanların deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları ve kan şekerleri ölçülmüştür.

Sol Ventrikül İçi Basınç Ölçümü

Heparinli pentobarbital (30 mg/kg) anestezi altında kalpler hızlı bir şekilde çıkarılarak önceden gazlandırılmış (%95 O_2 ve %5 CO_2 ile) Krebs-Hensleit çözeltisi [(mM olarak): NaCl 119; KCl 4,8; $CaCl_2$ 1,8; $MgSO_4$ 1,2; KH_2PO_4 1,2; $NaHCO_3$ 20; glukoz 10 ve pH: 7,4] içerisinde temizlenerek, Langendorff perfüzyon sistemine yerleştirilmiştir. Deney öncesi izole kalplerde atriyumlar alınarak ve atriyoventriküler nod ezilerek kalbin spontan aktivitesi engellenmiş, yalnızca dışarıdan uygulanan elektriksel uyarım ile tüm örneklerde aynı kalp atım hızı (uyarı frekansı 300 atım/dakika) elde edilmiştir. İzole kalbin kasılma gücü, sol ventrikül içine yerleştirilen içi sıvı dolu bir balon ile basınç değişimleri olarak ölçülmüştür. Bu koşullar altında, kalplerin sol ventrikül içi basınç değerleri 200 Hz örnekleme hızıyla, bir basınç çevi-

reci ve bir A/D dönüştürücü yardımıyla kaydedilmiştir. Balon içinde uyarı ile oluşan basınç değişiklikleri, intraventriküler (sol ventrikül) izovolumetrik basınç değişikliklerini temsil etmektedir (SVBD).

Kardiyomiyositlerin izolasyonu

Hafif anestezi altında (30 mg/kg sodyum pentobarbital) kalpler hızlı bir şekilde çıkarılıp, soğuk ve Ca^{2+} suz fizyolojik bir çözelti içerisine konularak, kollajenaz (1,2 mg/mL) perfüzyonu ile hücre izolasyonu yapılmıştır. Langendorff düzeneği yardımıyla aorttan ters perfüzyon yöntemi ile önce içeriği; (mM olarak) NaCl 130, 5,4 KCl, 1,4 $MgCl_2$, 0,4 NaH_2PO_4 , 5 HEPES, 10 glukoz ve 20 taurin, pH 7,4 olan ve %100 O_2 ile gazlandırılan, Ca^{2+} suz perfüzyon çözeltisi ile 5-dk boyunca perfüze edildikten sonra, kollajenaz içeren çözelti ile yaklaşık 25-dk boyunca perfüze edilmiştir. Perfüzyon süresinin bitiminde sistemden alınan kalp dokusu Ca^{2+} içermeyen perfüzyon solusyonu içerisine alınmış ve mekanik olarak küçük parçalara ayrılmıştır. Daha sonra, ince bir filtreden geçirilerek hücreler bir tüpün içerisine alınmış ve izole edilen hücreler 37°C'de, çözeltideki son Ca^{2+} miktarı 1,8 mM olacak şekilde kademeli olarak 0,3-0,5-1,0 mM Ca^{2+} içeren çözelti ile yıkanarak ölü hücrelerden arındırılmış ve deneye hazır hale getirilmiştir.

Hücre-içi Global Ca^{2+} Değişimlerinin Ölçümü

Hücre-içi serbest Ca^{2+} seviyesi ($[Ca^{2+}]_i$) ölçümlerinin yapılabilmesi için izole edilen kardiyomiyositler önce Fura-2 AM (4- μM) ile oda sıcaklığında 45-dk süreyle inkübe edilerek boyanmış, ve mikrospektroflorometre kullanarak (340 nm ile 380 nm dalga boylarında uyarılarak ve 520 nm dalga boyunda emisyon toplanarak) tek hücrede $[Ca^{2+}]_i$ ölçümü floresans şiddetindeki değişim olarak ölçülmüştür (PTI RatioMaster). Bu $[Ca^{2+}]_i$ ölçümlerinde kullanılan banyo çözeltisinin içeriği şu şekildedir: (mM olarak) NaCl

130, KCl 4,8, $MgSO_4$ 1,2, $CaCl_2$ 1,5, KH_2PO_4 1,2, HEPES 10 ve glukoz 10 (pH=7,4). Floresans boyaya şiddetindeki değişim kullanılarak, hücrelerden önce 20-s'lik bazal Ca^{2+} sinyali kaydedilmiş, daha sonra aksiyon potansiyelini mimik etmek amacıyla elektrik alan uyarısı kullanılarak (25-30 V'luk tek yönlü kare-biçimli ve 0,2 Hz frekansında elektriksiz uyarı) kuvvet içerisine alınan hücrelerden uyanılabilir olanı seçilerek ve bir pencere içine alınarak bu hücrelerde 200-s süre ile geçici (transient) $[Ca^{2+}]_i$ değişimleri kaydedilmiştir. Geçici $[Ca^{2+}]_i$ değişimlerinin kinetik analizi Microsoft Excell programı ile hazırlanan bir analiz algoritması ile gama dağılım fonksiyonuna uydurularak gerçekleştirilmiştir. Serbest $[Ca^{2+}]_i$ seviyeleri ile ilgili floresans sinyallerinin bazal değerden çıkarılarak ölçülen tepe değeri [maksimum floresans şiddeti ($\Delta F_{340/380}$)], tepeye çıkış süresi (TP) ve maksimum değerinin %50'sine iniş süresi (DT_{50}) ölçülerek, gruplar arasında karşılaştırılmalar yapılmıştır.

MetS'lu Sıçanlarda Serum Oksidan ve Antioksidan Seviyelerinin Ölçülmesi

Tüm sıçanların serumlarında "toplam antioksidan durum, TAS" ve "toplam oksidan durum, TOS" özel kolorimetrik kitleri kullanılarak ölçülmüştür (Rel Assay Diagnostic firması, RL0017 ve RL0024). TAS ölçümlerinde, vitamin E analogu olarak bilinen bir antioksidan olan Trolox ile kalibrasyon amacıyla kullanılmıştır. TOS ölçümlerinde ise kalibrasyon hidrojen peroksit ile yapılmıştır. Ortamda bulunan oksidanlar, deney ortamına eklediğimiz ferröz iyon çelator kompleksini ferrik iyon haline okside ederek, oluşan ferrik iyonlar deney ortamında bulunan kromojen ile renkli bir bileşik oluşturmaları sayesinde tespit edilmiştir. TAS ve TOS ölçümleri için, bir dizi kimyasal reaksiyon sonucunda oluşan renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülerek örneklerdeki antioksidan veya oksidan molekül yoğunlukları hesaplanmıştır.

İstatistiksel Analizler

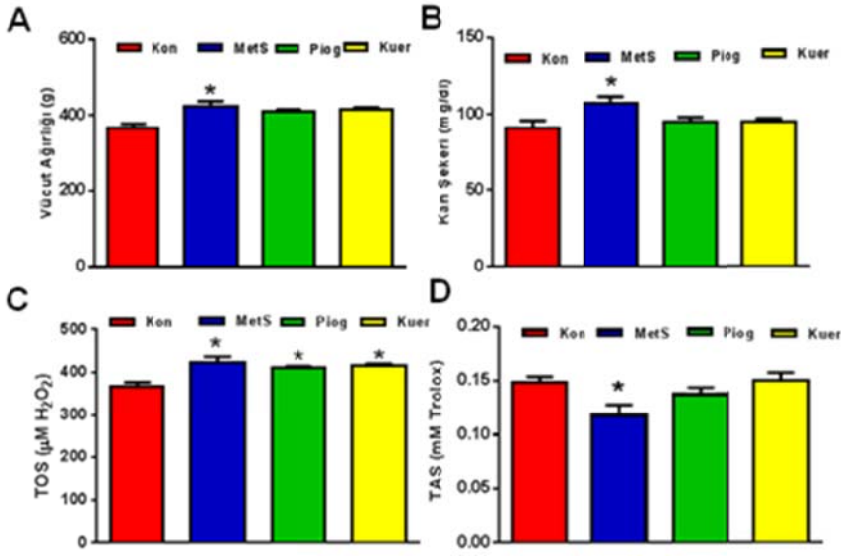
Tüm deney sonuçları ortalama ($\pm SEM$) olarak verilmiştir. Ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlılık seviyesi ANOVA (tukey-post-hoc) testi kullanılarak belirlenmiştir. Tüm değerlendirmelerde, istatistiksel anlamlılık test değeri ($p < 0,05$) seçilmiştir.

BULGULAR

Pioglitazon veya Kuersetin Uygulamasının MetS'lu Sıçanlarda Genel Etkileri

Önceki çalışmamızda, deneysel olarak sıçanlarda MetS oluşturmak için, %32 oranında sükröz içeren içme suyu kullanılmış olup, "Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği'nin Metabolik Sendrom Çalışma Grubu tarafından 2009 yılında yayımlanan faaliyet raporundaki kriterler tanıma dayanarak, bu hayvanlarda MetS'un oluştuğu en az 3 parametrenin (insülin direnci, glukoz intoleransı, hiperlipidemi, hiperinsulinemi ve hipertansiyon olguları gibi) varlığı ile gösterilmiştir (32). Yüksek sükrözle 18-hafta süre ile beslenen sıçanlarda (MetS-grubu) normal içme suyu ile beslenenlere (Kon-grubu) göre vücut ağırlıklarının ve kan glukoz değerlerinin daha yüksek olduğu ($p < 0,05$) gözlenmiştir (Şekil 1A ve B). Bu bulgular, daha önceki çalışmamızla ve diğer grupların bulguları ile uyumludur (29, 32-34). Pioglitazon veya kuersetin uygulaması bu artışları önleyerek, bu 2 grupta ölçülen değerlerin kontrol grubundan farklı olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$).

Tüm grupların serum örneklerinde kolorimetrik kitler kullanılarak, toplam oksidan durumu, TOS ve toplam antioksidan durumu, TAS ölçülmüş ve gruplar arası karşılaştırma yapılmıştır. Şekil 1C ve D'den görüldüğü gibi, MetS-grubunda Kon-grubuna göre önemli derecede yüksek ölçülen TOS değerinin her iki uygulama sonunda da yüksek kaldığı gözlenmiştir. Buna karşılık, hem pioglitazon ve hem de kuersetin uygulamaları MetS-grubunda azal-



Şekil 1: Deney hayvanlarının genel parametreleri. (A) Vücut ağırlıkları, (B) kan glukoz seviyeleri, (C) serum toplam oksidan durumu TOS ve (D) toplam antioksidan durumu, TAS seviyeleri. Bar-grafikler ortalama±SEM değerleri olup, MetS-, pioglitazon- veya kuersetin-uygulanmış MetS gruplarının (Piog ve Kuer) Kon-grubuna göre farklarının istatistiksel karşılaştırma seviyeleri *P<0,05 ile verilmiştir (her bir deney grubundan 7 hayvan örneği kullanılmıştır).

miş olan TAS değerini küçük fakat anlamlı şekilde normal değerlere doğru artmasına neden olmuştur (p<0,05).

Pioglitazon veya Kuersetin Uygulamasının MetS'lu Sıçanlarda Kalbin Mekanik Aktivitesine Etkileri

Daha önceki çalışmamızda ayrıntılı olarak incelendiği gibi (32), bu grup çalışmamızda da, MetS-grubu sıçanlarda sol ventrikülü basınç değişimleri (SVBD) Langendorff-perfüzyon sisteminde ölçülmüştür. Bu grupta SVBD değerlerinin Kon-grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede azaldığı (p<0,05), buna karşılık pioglitazon uygulaması bu azalmayı daha da dramatik hale getirirken, kuersetin uygulamasının ise bu azalmayı engelleyemediği gözlenmiştir. Dört farklı sıçan grubuna ölçülen orijinal SVBD eğrileri görülmektedir (Şekil 2A). Bar grafikler ise ortalama olarak ölçülen maksimum SVBD değerlerini göstermektedir (Şekil 2B).

Pioglitazon veya Kuersetinin MetS'lu Sıçanların İzole Kardiyomyositlerinde Hücre-içi Ca²⁺ Değişimlerine Etkileri

Sıçan kalbinden enzimatik yöntemle taze olarak izole edilen canlı kardiyomyositler floresans boya ile boyanarak (Fura-2AM), tek hücre seviyesinde hücre-içi bazal serbest Ca²⁺ seviyeleri, [Ca²⁺]_i ölçülerek gruplar arası karşılaştırma yapılmıştır. Şekil 2C'de görüldüğü gibi ortalama olarak MetS-grubunda bu değer Kon-grubuna göre önemli derecede yüksek (p<0,05) olduğu (Ca²⁺-yüklenmesi) gözlenmiştir. MetS-grubuna hem pioglitazon uygulaması ve hem de kuersetin uygulama bu artışı engelleyerek, normal değerlere geri dönmelerini sağlamıştır. Hücre seviyesinde yapılan çalışmalar, bu iki ajanın MetS-grubunda benzer etki yaparak, kardiyomyositlerdeki Ca²⁺-artışını (overload) önledikleri gözlenmiştir (p<0,05).

Floresans boya ile boyanmış kardiyomyositler elektrik alan uyarı altında bırakılarak (aksiyon potansiyelinin mimik edilmesi), geçici (transients)

[Ca²⁺]_i-değişimleri ölçülmüş olup bu değişimlerin farklı parametreleri hesaplanarak gruplar arası karşılaştırmalar yapılmıştır. Şekil 3A'da farklı grup kardiyomyositlerde elektrik alan altında mikrospektrofluorometre ile ölçülen orijinal [Ca²⁺]_i-değişimleri görülmektedir. Ortalama olarak [Ca²⁺]_i-değişimlerinin maksimum değerleri MetS-grubunda Kon-grubuna göre azalırken (p<0,05), hem pioglitazon ve hem de kuersetin uygulamasının bu azalmayı engelleyerek (p<0,05), normal değerlere geri dönmelerini sağlamıştır (Şekil 3B). Bu floresans değişimlerinin zaman deseni incelendiğinde, örneğin, floresansın maksimum değere yükselme sürecinin MetS-grubunda Kon-grubuna göre çok belirgin şekilde yavaşlamış olduğu (p<0,05), buna karşın her iki ajan uygulamasının bu uzamayı normal değerlere geri döndürdüğü (p<0,05) gözlenmiştir (Şekil 3C). Bunlara ek olarak, floresansın maksimum değerden geriye azalma süresinin %50'si ölçüldüğünde, bu sürenin MetS-grubunda Kon-grubuna göre çok belirgin şekilde yavaşlamış olduğu (p<0,05), buna karşın her iki ajan uygulamasının bu uzamayı engelleyebildiği fakat bu değişimin yine de normal değerlerin üzerinde olduğu (p<0,05) gözlenmiştir (Şekil 3D).

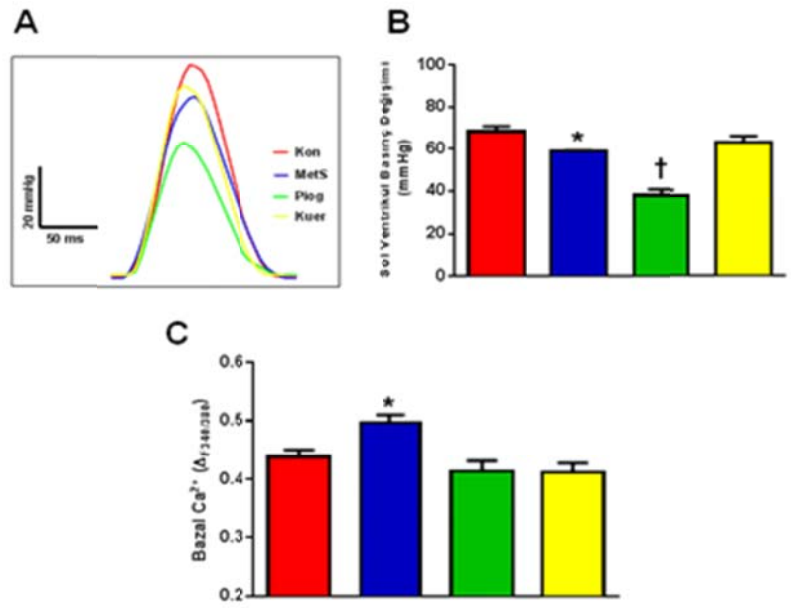
TARTIŞMA

Metabolik sendrom (MetS), genellikle obezite ve tip 2 diyabet hastalığı ile sonuçlanan, yüksek kan şekeri (hiperglisemi) düzeyi ve insülin direnci (hiperinsülinemi) ile karakterize ve yaşamımızı tehdit eden önemli bir metabolik hastalıktır. Yüksek şeker ile elde edilen MetS'lu sıçanlarda, bazal kalp fonksiyonunun bozulduğu, örneğin sol ventrikül sistolik basıncı azalırken diyastolik basınç değerinin arttığı gözlenmiştir ve aritmi görülme olasılığının çok yüksek olduğu bildirilmiştir (9, 24, 32, 35). MetS-grubu sıçan kalbinde gözlenen mekanik ativedeki bozulmanın/azalmanın altında yatan nedenler arasında, önceki çalışmamızda gözlemiş olduğumuz

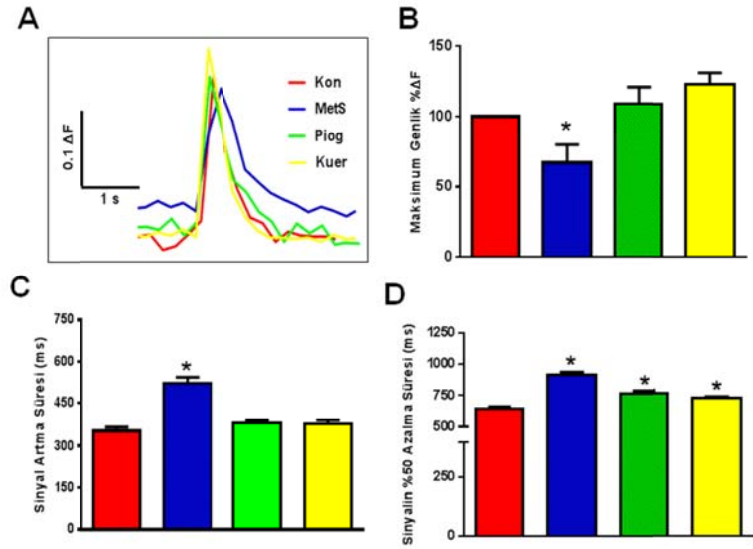
kalp dokusundaki miyofibril kayıpları ve organizasyon bozukluğu bulunduğunu düşündürmektedir (32). Kalp kasılma birimi olan miyofibrillerde gözlenen bu değişimler kalp kasılma gücünün azalmasının bir nedeni olarak değerlendirilebilir (36). MetS durumunda kalp doku örneklerinde gözlenen bağ doku birikimi ise dokunun elastik bileşenlerinde bozulmalar olduğunu göstermektedir ve bu değişimlerin kasılma-gevşeme süreçlerinde gözlediğimiz yavaşlamaya katkı sağladığını işaret etmektedir (37-42). Pioglitazon veya kuersetinin MetS grubu sıçanlara uygulamanın bu parametreleri etkileyemediğini, bu nedenle sol ventrikül içi basınç değişimlerinde herhangi bir pozitif inotropik etkiye (organ seviyesinde) neden olmadıklarını düşündürmektedir. Yapılan bir klinik çalışmada, pioglitazon tip 2 diyabetli hastalarda 6-ay süre ile kullanılmış fakat kalp fonksiyonları üzerinde önemli pozitif etkiler göstermediği bildirilmiştir (43).

Bu bulgumuzu destekler nitelikte, NIH tarafından (44) pioglitazonun diyabetli bireylerde ve diyabet ketoasidozda yararlı olmadığını ve hatta zararlı olduğunu işaret edilmiştir. Ayrıca, pioglitazonun sıvı tutulmasına ve periferik ödeme neden olduğu ve sıvı-aşırı yüklenmesi ile konjektif kalp yetmezliğine yol açtığı da ileri sürülmektedir (45, 46). Ayrıca, kuersetin uygulamasının MetS grubunda gözlenen mekanik aktivitedeki azalmada önemli bir düzelmeye neden olmadığı, buna karşılık TAS seviyesinde önemli derecede artışa neden olabilmesinin nedeni, kuersetin uygulamasının daha uzun süreli kullanılmasının gerekli olduğunu düşündürmektedir.

Diğer yandan, kontrol ve MetS gruplarından izole edilen kardiyomyositler elektriksel alan uyarımı ile uyarıldıklarında (aksiyon potansiyeli altında), hücre-içi bazal ve geçici Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_i$ değişimlerinin gruplar arasında şiddet ve zaman deseni olarak farklılık gösterdiği ve hem pioglitazon hem de kuersetin uygu-



Şekil 2: İzovolumetrik olarak sol ventrikül içi basınç değişimlerinin (SVBD) *in situ* olarak incelenmesi. (A) Orijinal basınç değişim eğrileri, (B) bar-grafikler gruplar için SVBD değerlerinin ortalama±SEM değerlerini ve (C) gruplar için izole ve Fura-2AM boyalı kardiyomyositlerde ölçülen bazal serbest Ca^{2+} seviyelerinin ($[Ca^{2+}]_i$) ortalama±SEM değerlerini göstermektedir. Deney gruplarının Kon-grubuna göre farklarının istatistiksel karşılaştırma seviyeleri $P<0,05$ ile Piog-grubunun MetS-grubuna göre farkının istatistiksel karşılaştırma seviyesi $P<0,05$ ile verilmiştir (her bir deney grubundan 5 hayvan kalbi ile bu kalplerden izole edilmiş 10-15 hücre kullanılmıştır).



Şekil 3: İzole ve Fura-2AM ile boyalı kardiyomyositlerde geçici hücre-içi serbest Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_i$ değişimleri. (A) Farklı gruplara ait kardiyomyositler, elektriksel uyarı altında (aksiyon potansiyeli altında) uyarılarak (25-30 V'luk sinyal ile 0,2 Hz frekansında) ölçülen geçici floresan değişimlerine (geçici $[Ca^{2+}]_i$) ait orijinal örnek eğrileri. Maksimum floresan şiddet değişimleri (B), floresansın maksimum değerine çıkış süreleri (C), ve floresansın maksimum değerinden sönme/azalma değerinin % 50'sine iniş süreleri (D) ortalama±SEM olarak verilmiştir. Deney gruplarının Kon-grubuna göre farklarının istatistiksel karşılaştırma seviyeleri $P<0,05$ ile verilmiştir (her bir deney grubuna ait 5 hayvan kalbinden izole edilmiş 10-15 hücre kullanılmıştır).

lamasının bu değişimleri tam olarak kontrol grubu değerlerine geri döndürdüğü gözlenmiştir. Bu 2 ajan uygulaması, MetS indüklü değişen $[Ca^{2+}]_i$ ile ilgili mekanizmaları hücre seviyesinde pozitif yönde etkilediği gözlenmiştir. MetS'lu sıçan kardiyomiyositlerinde elektriksel uyarım ile gözlenen $[Ca^{2+}]_i$ yanıtlarındaki bu değişim MetS'da gözlenen kalp fonksiyon bozukluğunun yapısal temelini yanında işlevsel temele de dayandığını göstermektedir. Bu sonuçlar MetS deney modellerinde kaydedilen önceki veriler tarafından desteklenmektedir (20, 24, 29, 31, 47, 48). Önceki çalışmalarda, yüksek şükroz içerikli diyet ile MetS deney modeli oluştu-

ran sıçanlarda ventriküler miyositlerin kısalma ve tekrar uzama evrelerinin kontrole göre (%42-63) daha yavaş olduğu görülmüştür (47). Mellor ve ark. (48) 2012 yılında yayınladıkları çalışmada ise geçici $[Ca^{2+}]_i$ değişimlerinin şiddetinin kontrole göre %42 düştüğünü, geçici $[Ca^{2+}]_i$ floresans sönümlenme fazının zaman sabitinin ise %24 oranında uzadığını göstermişlerdir. Bu bulgular bizim bulgularımızla uyumlu olup, kalbin mekanik aktivitesindeki MetS indüklü değişimleri açıklayabilmektedir. Hem pioglitazon hem de kuersetin uygulamaları bu parametreleri MetS grubunda önemli derecelerde etkilemiştir.

Sonuç olarak bu çalışma, MetS-indüklü kalp fonksiyon bozukluğunda artan oksidatif stresin ve azalan antioksidan savunma sisteminin rol oynadığını, yeterli miktarlarda ve sürelerde antioksidan kullanılmasının MetS'lu bireylerde kalbin mekanik aktivitesi üzerinde koruyucu etkilere neden olabileceğini işaret etmektedir. Ayrıca, insülin-duyarlaştırıcı olarak kullanılan pioglitazonun güvenli bir şekilde MetS-grupta kullanılabilmesi için (klinik uygulamalar için) birçok farklı parametrelerin daha incelenmesinin gerekli olduğu bu çalışma sonuçları ile sergilenmek istenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Reaven GM, Chang H, Hoffman BB. Additive hypoglycemic effects of drugs that modify free-fatty acid metabolism by different mechanisms in rats with streptozocin-induced diabetes. *Diabetes* 1988;37: 28-32.
2. Hanson RL, Imperatore G, Bennett PH, et al. Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51: 3120-3127.
3. Meigs JB, Nathan DM, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW, Framingham Offspring S. Fasting and postchallenge glycemia and cardiovascular disease risk: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care* 2002;25: 1845-1850.
4. Gundogan K, Bayram F, Capak M, et al. Prevalence of metabolic syndrome in the Mediterranean region of Turkey: evaluation of hypertension, diabetes mellitus, obesity, and dyslipidemia. *Metab Syndr Relat Disord*. 2009;7: 427-434.
5. Demiral Y, Soysal A, Can Bilgin A, et al. The association of job strain with coronary heart disease and metabolic syndrome in municipal workers in Turkey. *J Occup Health* 2006;48: 332-338.
6. Onat A, Yuksel M, Koroglu B, et al. [Turkish Adult Risk Factor Study survey 2012: overall and coronary mortality and trends in the prevalence of metabolic syndrome]. *Turk Kardiyol Dern Ars* 2013;41: 373-378.
7. Onat A. On the coronary heart disease mortality in Turkey. *Atherosclerosis* 2002;163: 203-204.
8. Soysal A, Demiral Y, Soysal D, et al. The prevalence of metabolic syndrome among young adults in Izmir, Turkey. *Anadolu Kardiyol Derg* 2005;5: 196-201.
9. Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, et al. High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011;57: 51-64.
10. Davidoff AJ, Mason MM, Davidson MB, et al. Sucrose-induced cardiomyocyte dysfunction is both preventable and reversible with clinically relevant treatments. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286: E718-724.
11. Fang ZY, Schull-Meade R, Downey M, et al. Determinants of subclinical diabetic heart disease. *Diabetologia* 2005;48: 394-402.
12. de Freitas EV, Brandao AA, Pozzan R, et al. Study of the intima-media thickening in carotid arteries of healthy elderly with high blood pressure and elderly with high blood pressure and dyslipidemia. *Clin Interv Aging* 2008;3: 525-534.
13. Gonsolin D, Couturier K, Garait B, et al. High dietary sucrose triggers hyperinsulinemia, increases myocardial beta-oxidation, reduces glycolytic flux and delays post-ischemic contractile recovery. *Mol Cell Biochem* 2007;295: 217-228.
14. Pang PS, Cleland JG, Teerlink JR, et al. A proposal to standardize dyspnoea measurement in clinical trials of acute heart failure syndromes: the need for a uniform approach. *Eur Heart J* 2008;29: 816-824.
15. Davidoff AW, Boyden PA, Schwartz K, et al. Congestive heart failure after myocardial infarction in the rat: cardiac force and spontaneous sarcomere activity. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1015: 84-95.
16. Banos G, Medina-Campos ON, Maldonado PD, et al. Activities of antioxidant enzymes in two stages of pathology development in sucrose-fed rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2005;83: 278-286.
17. Cardenas G, Carlos Torres J, Zamora J, et al. Isolated heart function after ischemia and reperfusion in sucrose-fed rats: influence of gender and treatment. *Clin Exp Hypertens* 2006;28: 85-107.
18. Perez-Torres I, El Hafidi M, Infante O, et al. Effects of sex hormone levels on aortic vascular reactivity and variables associated with the metabolic syndrome in sucrose-fed female rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2008;86: 25-35.
19. Perricone NV, Bagchi D, Echard B, et al. Blood pressure lowering effects of niacin-bound chromium(III) (NBC) in sucrose-fed rats: renin-angiotensin system. *J Inorg Biochem* 2008;102: 1541-1548.
20. Ilkun O, Boudina S. Cardiac dysfunction and oxidative stress in the metabolic syndrome: an update on antioxidant therapies. *Curr Pharm Des* 2013;19: 4806-4817.
21. Whaley-Connell A, Sowers JR. Oxidative stress in the cardiorenal metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep* 2012;14: 360-365.

22. Strakovsky RS, Pan YX. In utero oxidative stress epigenetically programs antioxidant defense capacity and adulthood disease. *Antioxid Redox Signal* 2012;17: 237-253.
23. Ren J, Pulakat L, Whaley-Connell A, Sowers JR. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J Mol Med (Berl)* 2010;88: 993-1001.
24. Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, et al. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism* 2006;55: 928-934.
25. Abbas A, Milles J, Ramachandran S. Rosuvastatin and atorvastatin: comparative effects on glucose metabolism in non-diabetic patients with dyslipidaemia. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes* 2012;5: 13-30.
26. Hemmeryckx B, Hoylaerts MF, Gallacher DJ, et al. Does rosiglitazone affect adiposity and cardiac function in genetic diabetic mice? *Eur J Pharmacol* 2013;700: 23-31.
27. Thackeray JT, deKemp RA, Beanlands RS, et al. Early diabetes treatment does not prevent sympathetic dysinnervation in the streptozotocin diabetic rat heart. *J Nucl Cardiol* 2014;21: 829-841.
28. Yilmaz M, Bukan N, Demirci H, et al. Serum resistin and adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2009;25: 246-252.
29. Vasanji Z, Cantor EJ, Juric D, et al. Alterations in cardiac contractile performance and sarcoplasmic reticulum function in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291: C772-780.
30. Breunig IM, Shaya FT, McPherson ML, et al. Development of heart failure in Medicaid patients with type 2 diabetes treated with pioglitazone, rosiglitazone, or metformin. *J Manag Care Spec Pharm* 2014;20: 895-903.
31. Palee S, Chattipakorn S, Phrommintikul A, et al. PPARgamma activator, rosiglitazone: Is it beneficial or harmful to the cardiovascular system? *World J Cardiol* 2011;3: 144-152.
32. Okatan EN, Kizil S, Gokturk H, et al. High-carbohydrate diet-induced myocardial remodelling in rats. *Curr Res Cardiol* 2015; 2(1):5-10.
33. Balderas-Villalobos J, Molina-Munoz T, Mailloux-Salinas P, et al. Oxidative stress in cardiomyocytes contributes to decreased SERCA2a activity in rats with metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;305: H1344-1353.
34. Aguilera AA, Diaz GH, Barcelata ML, et al. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* 2004;15: 350-357.
35. Dutta K, Podolin DA, Davidson MB, et al. Cardiomyocyte dysfunction in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. *Diabetes* 2001;50: 1186-1192.
36. Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, et al. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res* 1989;64: 1041-1050.
37. Heerkens YF, Woittiez RD, Kiela J, et al. Mechanical properties of passive rat muscle during sinusoidal stretching. *Pflügers Arch* 1987;409: 438-447.
38. Nikolic S, Yellin EL, Tamura K, et al. Passive properties of canine left ventricle: diastolic stiffness and restoring forces. *Circ Res* 1988;62: 1210-1222.
39. Thiedemann KU, Holubarsch C, Medugorac I, et al. Connective tissue content and myocardial stiffness in pressure overload hypertrophy. A combined study of morphologic, morphometric, biochemical, and mechanical parameters. *Basic Res Cardiol* 1983;78: 140-155.
40. Riva E, Andreoni G, Bianchi R, et al. Changes in diastolic function and collagen content in normotensive and hypertensive rats with long-term streptozotocin-induced diabetes. *Pharmacol Res* 1998;37: 233-240.
41. Regan TJ, Wu CF, Yeh CK, et al. Myocardial composition and function in diabetes. The effects of chronic insulin use. *Circ Res* 1981;49: 1268-1277.
42. Burlew BS, Weber KT. Connective tissue and the heart. Functional significance and regulatory mechanisms. *Cardiol Clin* 2000;18: 435-442.
43. Dorkhan M, Dencker M, Stagmo M, et al. Effect of pioglitazone versus insulin glargine on cardiac size, function, and measures of fluid retention in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 2009;8: 15.
44. U.S. National Library of Medicine. "ACTOS (pioglitazone hydrochloride) tablet". National Institutes of Health. 2010.
45. Berria R, Gastaldelli A, Lucidi S, et al. Reduction in hematocrit level after pioglitazone treatment is correlated with decreased plasma free testosterone level, not hemodilution, in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Pharmacol Ther* 2006;80: 105-114.
46. Nissen SE, Nicholls SJ, Wolski K, et al. Comparison of pioglitazone vs glimepiride on progression of coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes: the PERISCOPE randomized controlled trial. *Jama* 2008;299: 1561-1573.
47. Miklos Z, Kemecei P, Biro T, et al. Early cardiac dysfunction is rescued by upregulation of SERCA2a pump activity in a rat model of metabolic syndrome. *Acta Physiol (Oxf)* 2012;205: 381-393.
48. Mellor KM, Wendt IR, Ritchie RH, et al. Fructose diet treatment in mice induces fundamental disturbance of cardiomyocyte Ca²⁺ handling and myofilament responsiveness. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;302: H964-972

