

ORJİNAL YAZI

Dişi Sıçanlarda Streptozotosin İle Oluşturulmuş Diyabetin Kalp Kası Üzerine Etkisinin Ultrastrüktürel Düzeyde Gösterilmesi*

Gülnur TAKE**, Gülten KARABAY**, A. Canan YAZICI***, Deniz ERDOĞAN****

** Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

*** Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara.

**** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Çalışmada streptozotosin ile kronik diyabet oluşturulmuş dişi sıçanlarda ventriküler kalp kasının ultrastrüktürel düzeyde incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada 18 adet dişi erişkin sıçanlardan 3 grup oluşturulmuştur. 1. grup: kontrol (n=6), 2. grup: sham kontrol (n=6), 3. grup: diyabet (45mg/kg streptozotosin) (n=6). 8 hafta sonra diyabet ve kontrol gruplarından sol ventrikül bölgeleri alınarak, LEO 906E transmission elektron mikroskopta incelenmiştir.

Diyabetik grubun kas hücrelerinde belirgin dejeneratif değişiklikler saptanmıştır. Mitokondrionlarda belirgin şişkinlik ve kristolizis, sitoplazmada yaygın lipid birikimi, miyoflamanlarda yaygın silinme dikkati çekmiştir. Z bantlarında düzensiz seyir ile silinme izlenmiştir. Ayrıca interkalat disklerde dilatasyon iliyi çekmiştir.

Bulgularımız ışığında yapılan değerlendirmede, kadınların diyabetten erken dönemde etkilendiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kalp. Deneysel diyabet. Dişi sıçan. İnce Yapı.

Ultrastructural Demonstration Of The Effects Of Streptozotocin-Induced Diabetes On Heart Muscle In Female Rats

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the ultrastructural alterations in ventricular cardiac muscle cells in female rats in which chronic diabetes was induced with streptozotocin.

Mature female rats (n=18) were assigned into 3 groups: Group 1: the controls (n=6), Group 2: the sham controls (n=6), and Group 3: the diabetic (n=6). Eight weeks after injection, left ventricle muscles were extracted and examined with a LEO 906E transmission electron microscope.

The electron microscopic analyses of the left ventricle wall revealed prominent degenerative alterations in the myocardial cells of diabetic rats. Swelling and crystalolysis in the mitochondria, lipid deposition in the cytoplasm, and widespread effacement of myofilaments were detected. The Z bands were irregular and effacement was noted. In addition, the intercalated discs were dilated.

As a result, it can be suggested that females are affected at the early stages of diabetes mellitus.

Key Words: Heart. Experimental diabetes mellitus. Female rat. Ultrastructure.

Diyabetes mellitus kronik metabolik bir hastalıktır. Pankreas B hücrelerinden salgılanan insülin eksikliğine bağlı olarak gelişen hastalığın literatürde bir çok

yan etkisi bildirilmiştir. Bunların içerisinde nöropati, retinopati, nefropati ve vasküler patolojilerin hızlanması sayılabilir¹.

Yapılan klinik ve deneysel çalışmalar sonucunda diyabetin çeşitli kardiyak bozukluklara da neden olduğu gösterilmiştir^{2,3}. Diyabetik bireylerde koroner ateroskleroz sıklıkla gözlenmektedir⁴. Dolayısıyla, bu bireylerde kardiyak ölümlerin nedeni esas olarak koroner ateroskleroza bağlanmaktadır⁵. Ancak literatürde diyabetik bireylerde vasküler patogenezin dışında kalp kası hücrelerinde kontraktıl disfonksiyonun da sıklıkla gözlendiği bildirilmiştir⁶.

Diyabetik bireyler üzerinde günümüze değin yapılan araştırmalarda, diyabetin neden olduğu kontraktıl disfonksiyon insidansının koroner arter patolojilerine

Geliş Tarihi 09.11.2004

Kabul Tarihi: 06.12.2004

* Bu çalışma "Uluslararası Katılımlı 16. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi"nde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Dr. Gülnur TAKE

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji ABD

Eskişehir Yolu 20.km Bağlıca Kampusü

Etimesgut / ANKARA

Tel: 0 312 234 10 10 / 1571-1572

e-mail: gulnur@baskent.edu.tr

göre çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu oranın kadınlarda erkeklerden daha belirgin oranda yüksek olduğu vurgulanmaktadır⁷. Yapılan istatistiksel bir çalışmada genel populasyona göre diyabetik erkeklerde üç, kadınlarda ise beş kat daha fazla kalp kası hücrelerinde kontraktilite patolojilerinin olduğu bildirilmiştir⁸.

Ancak yayınlanan istatistiksel çalışmaların yanında, diyabetik kadınlarda hastalığın neden olduğu kontraktil disfonksiyonun incelendiği deneysel bir çalışmaya raslanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada miyokardiyal anomalilerin, dişi sıçanlarda oluşturulan diyabet modellerinde elektron mikroskop düzeyinde incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Diyabet oluşturulması ve deney grupları

Çalışmada 18 adet Spraque Dawley cinsi dişi erişkin sıçanlardan 3 grup oluşturulmuştur. 1. grup: kontrol (n=6) (hiçbir işlem yapılmayan yaş uyumlu grup), 2. grup: sham kontrol (n=6) (tek doz i.v sodyum sitrat enjeksiyonu yapılan grup), 3. grup: diyabet (n=6) (tek doz i.v 45mg/kg, sodyum sitrat tamponu içerisinde çözünmüş Streptozotosin (STZ) enjeksiyonu yapılan grup).

Kan şekerlerinin ölçülmesi

Uygulamayı izleyen üçüncü günde, deneklerin kuyruk venlerinden kan alınarak glukometre (Aquo-Check, Roche) ile kan şeker ölçümü yapılmıştır. Diyabet grubunu oluşturan sıçanların kan şeker düzeyi ortalama olarak 396 – 415mg/dl, sham kontrol grubunda 96-101mg/dl, kontrol grubunda ise 95-98mg/dl olarak ölçülmüştür. Sıçanlar sekiz hafta süresince her gün kafesleri temizlenerek, serbest diyet ve su ile beslenmeleri sağlanarak bakılmışlardır. Deneklerin haftada iki kez kan şekerler düzeyleri glukometre ile kontrol edilmiştir.

Dokuların eldesi

Sekiz haftanın sonunda istatistiksel değerlendirme için tüm gruplara ait deneklerin kan şeker düzeyleri, vücut ağırlıkları ölçülmüştür. Sonrasında tüm sıçanlar pentotal sodyum (50mg/kg) anestezisi altında açılmış, istatistiksel değerlendirme için ağırlıkları ölçülen kalp dokularının sol ventrikül duvarlarından doku örnekleri alınmıştır.

Elektron mikroskopik yöntem

1mm³'lük parçalara bölünen doku örnekleri 0.1M fosfat tamponlu %2.5'lik gluteraldehitte (pH 7.4) 2 saat tespit edilmişlerdir. Tespit süresi bitiminde tampon ile 3 kez yıkanan dokular 1 saat %1'lik osmiyum tetraoksit etkin bırakılarak post fiksasyonları yapılmıştır. Süre bitiminde dereceli alkol serilerinden geçirilen dokuların dehidrate olmaları sağlanmıştır. Son olarak propilen oksite etkin bırakılan dokular Araldit CY212 kit ile hazırlanan gömme materyali ile

blok haline getirilmişlerdir. 56° C'lık etüvde 48 saat polimerize edilen bloklardan yarı-ince kesitler alınarak toluidin blue ile boyanmış ve ışık mikroskopta incelenmiştir. İşaretlenen bölgelerden alınan ince kesitler uranil asetat – kurşun sitrat ile boyanarak LEO 906E transmission elektron mikroskopta (TEM) değerlendirilmiştir ve bulguları yansıtan uygun büyütmelerde resimlendirilmiştir.

İstatistiksel yöntem

Veri seti Kolmogorow-Smirnow testi, Kruskall Wallis Tek Yönlü Varyans Analizi ve Bonferroni – Dunn testi (CD_{KW}) yöntemleri ile analiz edilmiştir. İstatistik analizler MINITAB 13.0 ve SPSS 11.5 İstatistik Paket Programları ile yapılmıştır.

Bulgular

İstatistiksel bulgular

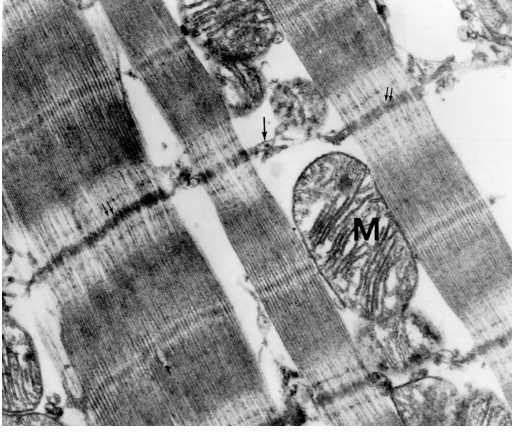
Vücut ağırlığı, kalp ağırlığı, kalp ağırlığı / vücut ağırlığı oranı ve kan şekeri değişkenlerinin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorow-Smirnow testi ile incelenmiş ve gözlem değerlerinin normal dağılım göstermediği belirlenmiştir (p<0.05). Söz konusu değişkenler bakımından kontrol, sham kontrol ve diyabet gruplarının ortalamaları arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli olup olmadığı, veriler normal dağılım göstermediğinden ve kan şekeri düzeyi değişkeni bakımından gruplar arası varyanslar da homojen olmadığından parametrik olmayan istatistiksel analiz yöntemlerinden Kruskall Wallis Tek Yönlü Varyans Analizi ve Bonferroni–Dunn testi (CD_{KW}) yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, Ortalama ± Standart Hata ($\bar{X} \pm S_x$) ve p değeri olarak Tablo I.de verilmiştir. Anlamlılık düzeyi p < 0.05 olarak dikkate alınmıştır.

Vücut ağırlığı, kalp ağırlığı, kalp ağırlığı / vücut ağırlığı oranı ve kan şekeri düzeyi bakımından kontrol ve sham kontrol grubu ortalamaları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ancak diyabet grubu ortalaması her iki gruptan da anlamlı düzeyde farklıdır (p < 0.01).

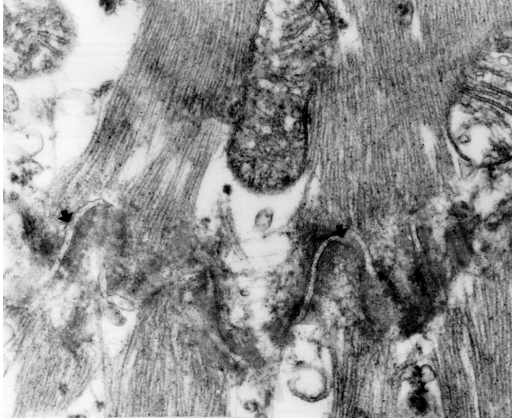
Elektron mikroskopik bulgular

Kontrol ve sham kontrol gruplarında kalp kası hücreleri normal morfolojileriyle izlenmiştir. Kontrol grubuna ait kalp kası hücrelerinde mitokondriyonların normal boyutlarda olduğu ve normal yapıda kristalara sahip olduğu belirlenmiştir. Hücrelerde lipid ve glikojen birikimi izlenmemiş olup sarkoplazmik retikulumlar da normal yapıda gözlenmiştir. Miyofibrilleri oluşturan miyoflamanların düzenli seyir gösterdiği interkalat disklerin de yapısal olarak normal olduğu saptanmıştır (Şekil 1-2). Sham kontrol grubunda da genel yapı kontrol grubuna eşdeğer olarak bulunmuştur.

Diyabetin Kalp Kası Üzerine Etkisi

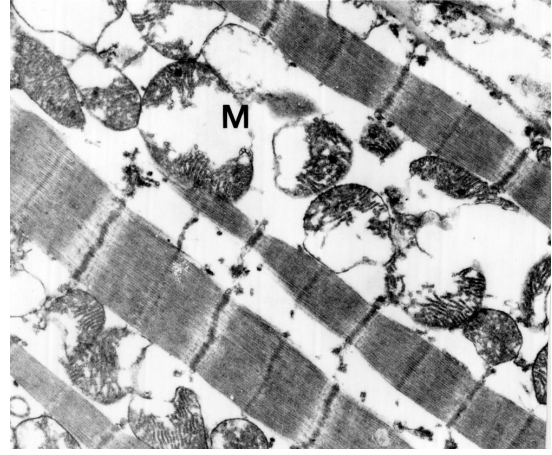


Şekil 1:
Kontrol grubu. Kalp kası hücrelerine ait mitokondriyonlar (M), Z bantları (↑↑) ve Sarkoplazmik retikulum sisternaları (↑) normal yapıları ile izleniyor (Uranil asetat – kurşun sitrat X16700)

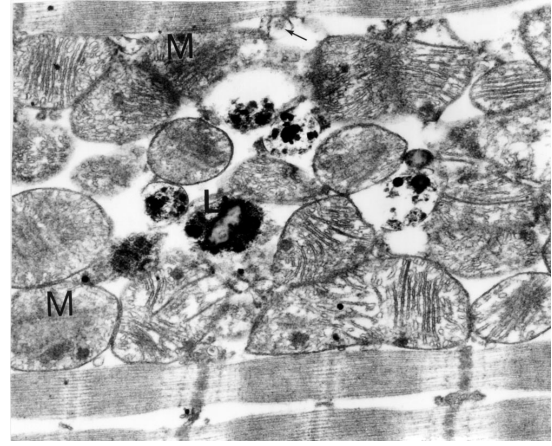


Şekil 2:
Kontrol grubu. İnterkalat diskler (➡) normal yapıları ile gözleniyor (Uranil asetat – kurşun sitrat X27800).

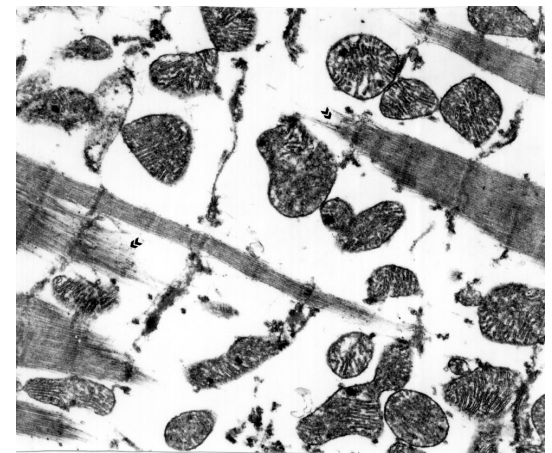
8 haftalık diyabet grubunda kalp kası hücreleri ultrastrüktürel düzeyde incelendiğinde kontrol grubuna göre belirgin düzeyde dejenerasyon olduğu dikkati çekmiştir. Özellikle hücrelerin büyük çoğunluğunda mitokondriyonlarda şişme ve kristolizis son derece belirgin olarak gözlenmiştir (Şekil 3). Bazı mitokondriyonlarda ise krista fragmentasyonu ve matrikste elektron yoğun amorf madde birikimi saptanmıştır. Sarkoplazmik retikulum sisternalarında dilatasyon ve vakuoler oluşum gözlenmiştir. Yine bu alanlarda yoğun lipid depositleri dikkati çekmiştir (Şekil 4). Hücre içerisindeki miyoflamanlar incelendiğinde çoğunda yaygın silinme ve buna bağlı olarak miyofibril kaybı son derece belirgindir (Şekil 5). Büyük büyültmelerde Z bantları incelendiğinde genel seyrinde düzensizlik yer yer de silinme gözlenmiştir. (Şekil 6). İnterkalat disklerin de diyabetten belirgin olarak etkilendiği saptanmıştır. Tüm deneklerde interkalat disklerde yapısal bozulma ile birlikte miyoflamanlardan ayrılma iliyi çekmiştir (Şekil 7).



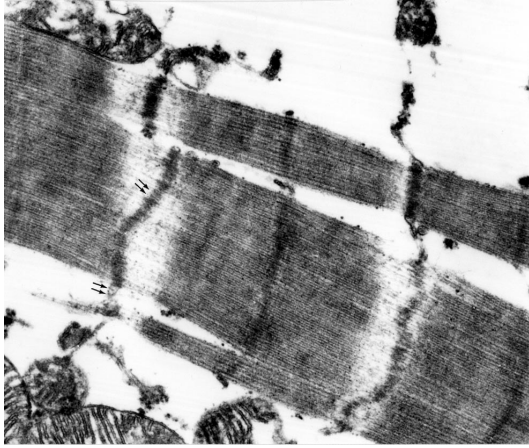
Şekil 3:
Diyabetik grup. Kalp kası hücrelerine ait mitokondriyonlarda (M) şişkinlik ve kristolizis belirgin (Uranil asetat – kurşun sitrat X10000).



Şekil 4:
Diyabetik grup. Kalp kası hücrelerindeki yoğun lipid birikimi (L), mitokondriyonlarda (M) fragmentasyon ve yoğun amorf madde birikimi ile sarkoplazmik retikulum sisternalarında (↑) vakuoler değişim gözleniyor (Uranil asetat – kurşun sitrat X16700).

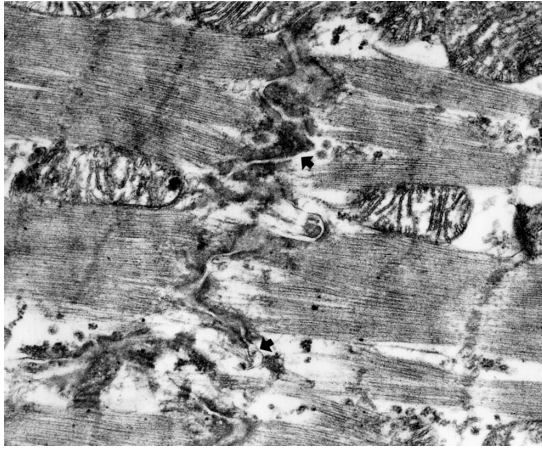


Şekil 5:
Diyabetik grup. Kalp kası hücrelerindeki miyoflamanlarda yaygın silinme (>>) izleniyor (Uranil asetat – kurşun sitrat X10000).



Şekil 6:

Diyabetik grup. Kalp kası hücrelerinde, Z bantlarında (\uparrow) düzensiz seyir ve silinme belirgin (Uranil asetat – kurşun sitrat X21560).



Şekil 7:

Diyabetik grup. Dejenere görünümde interkalat diskler gözleniyor (Uranil asetat – kurşun sitrat X16700).

Tablo I- İstatistik Analiz Sonuçları

	Kontrol (n = 6)	Sham Kontrol (n = 6)	Diyabet (n=6)	p değeri
	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	
Vücut Ağırlığı	256.667±8.913	244.667±4.807	145.667±11.500**	p < 0.01
Kalp Ağırlığı	1.167±0.011	1.152±0.005	0.970±0.010**	p < 0.01
Kan Şeker Düzeyi	95.833±0.477	99.167±0.750	403.167±4.094**	p < 0.01
Kalp Ağırlığı/Vücut Ağırlığı	0.0046±0.0002	0.0047±0.0008	0.0068±0.0005**	p < 0.01

** Sözü konusu grup ortalaması aynı satırda yer alan diğer grup ortalamalarından farklıdır (p < 0.01).

Tartışma ve Sonuç

Diyabetes mellitus'un çeşitli kardiyak anomalilerle sonuçlandığı klinik ve deneysel çalışmalarla gösterilmiştir^{2,3}. Diyabetik bireylerde kardiyak ölümlerin asıl nedeni koroner ateroskleroza bağlanmaktadır⁵. Ancak yapılan araştırmalar miyokard kontraktıl disfonksiyon insidansının, koroner arter hastalıkları-

na oranla fazla olduğunu göstermektedir. Özellikle kadın hastalarda bu tablonun daha belirgin olduğu bildirilmiştir⁷.

Son yıllarda diyabetik bireylerde gözlenen kalp hastalıkları oranının artması ve miyokardiyal infraktüs sonrasında artan ölüm oranının nedeni diyabetik kardiyomiyopati ile açıklanmaya çalışılmaktadır⁸. Kardiyomiyopati; miyokardiyal disfonksiyon ile sonuçlanan heterojen bir patolojidir⁹. Diyabetik kardiyomiyopati sol ventrikül basıncının azalması şeklinde sonuçlanan fonksiyonel bozukluklara neden olmaktadır ve bu fonksiyon bozukluklarının kalp kası hücrelerinde olaylanan yapısal değişiklikler sonucunda gerçekleştiği düşünülmektedir. Kardiyomiyopatiye miyokartta hipertrofi, fibrozis ve kalp kası hücrelerinde lipid birikimi gözlenmektedir¹⁰.

Bu konuda 1980'li yıllarda diyabet modelleri oluşturmak amaçlı alloxan kullanılmış ve çalışmalarda farklı türlerden erkek denekler kullanılmıştır; tavşanlar ile yapılan bir araştırmada diyabet oluşumunu izleyen 10. haftada mitokondriyonlarda şişkinlik ve fragmentasyon, mitokondriyal matriks içerisinde elektron yoğun amorf maddelerin varlığı ve kristolizisin varlığı gözlenmiştir. Ek olarak sitoplazmada lipid ve glikojen birikimi olduğu, sarkoplazmik retikulum dilatasyonu ve dilate sarkoplazmik retikulum içerisinde değişik yoğunluktaki madde birikimi gözlenmiştir. Aynı araştırmacılar miyofibrillerde de dejeneratif değişikliklerin olaylandığını belirtmişlerdir¹¹. Thompson¹², sıçanlarla yaptığı araştırmada, 12 haftalık diyabette mitokondriyal dejenerasyonun çok belirgin olmadığını vurgulamıştır. Araştırmacı yaptığı incelemesinde, fokal miyofibril kaybı, transfer tübül ve sarkoplazmik retikulumlarda kayıp, interkalat disklerde ayrılmalar gözlemlemiştir. Bir diğer çalışmacı ise köpeklerde alloxan ile diyabet oluşturmuş ve Z bantlarında belirgin genişleme olduğunu bildirmiştir¹³.

Alloxandan sonra sıklıkla kullanılan bir diğer ajan ise STZ'dir. Araştırmacılar erkek sıçanlar kullanarak STZ enjeksiyonu ile oluşturulan diyabet modellerinde erken dönemden başlayarak geniş bir zaman diliminde kalp kası hücrelerindeki yapısal değişimleri inceleyen bir çok çalışma yapmışlardır¹⁴⁻¹⁶.

Harackova ve Murphy¹⁴, STZ ile oluşturulan diyabetik sıçanlarda 8-10 haftalık süreçte ventriküler kalp kası hücrelerinde minimal düzeyde değişiklik olduğunu savunmuşlardır.

Zhu ve ark.¹⁵, erkek sıçanlarda STZ ile oluşturulan diyabet sonrası 4. haftada ventriküler kalp kası hücrelerine ait mitokondriyonlarda şişkinlik ve dejenerasyon olduğunu, 8. haftada interkalat disklerde dilatasyon, ve hücre içerisinde glikojen birikimi olduğunu bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada da diyabeti izleyen 8. haftada interkalat disklerde dejenerasyon bildirilmiştir¹⁶.

Diyabetin Kalp Kası Üzerine Etkisi

Bir diğer araştırmacı ise 60-65 mg/kg STZ enjeksiyonu ile erkek sıçanlarda oluşturduğu diyabet modellerinde 12 hafta sonunda yaptığı elektron mikroskopik incelemede Zhu ve ark.'nın tüm bulgularına ek olarak miyofibrillerde dejeneratif değişiklikler, lipid birikimi ve çekirdekte kromatin kondensasyonu gözlemlemişlerdir¹⁷. McGrath ve McNeill¹⁸ diyabeti izleyen 12. haftada sarkoplazmik retikuluma komşu alanlarda orta deceleli ödem gözlemlemişlerdir. Başka çalışmalarda diyabeti izleyen 16 ve 24 haftalık erkek sıçanlarda da benzer bulgular gözlemlenmiş ek olarak sitoplazmada vakuollerin şekillendiği ve sarkoplazmik retikuluma azalma izlenmiştir^{19,20}. McGrath ve McNeill¹⁸ ise 32 haftalık diyabette dahi interkalat disklerde çok belirgin değişiklik olmadığını savunmuştur.

Bizim çalışmamızda da, dişi sıçanlarda düşük doz (45mg/kg) STZ ile oluşturulan diyabet modelinde 8 hafta sonunda sol ventrikül kas hücreleri incelenmiştir. Tüm araştırmacıların bulgularına paralel olarak bizim bulgularımızda da mitokondriyal dejenerasyon belirgin olarak izlenmiştir. Literatürde erkek sıçanlarda 10. haftada gözlenen mitokondriyal krista fragmantasyonu ve amorf madde birikimi¹¹, bizim çalışmamızda 8. haftada dişi sıçanlarda gözlemlenmiştir. Sitoplazmadaki lipid birikimi değerlendirildiğinde, yayınlarda erkek sıçanlarda 12. haftada gözlemlenen bu birikimi¹⁷, bizim çalışmamızda, 8. haftada, çok belirgin olarak saptanmıştır. Yine bizim bulgularımızda Z bandında düzensiz seyir de ek olarak gözlemlenmiştir. Diyabetin aynı döneminde erkek sıçanlarda bildirilmeyen ve bizim saptadığımız bir diğer değişiklik ise miyoflaman kaybı olmuştur. Ek olarak bu çalışmada araştırmacıların farklı yorum yaptığı interkalat disklerde de belirgin dejeneratif değişiklikler izlenmiştir.

Literatürde diyabete bağlı kalp hacminde de azalma olduğuna dair veriler bulunmaktadır. Cai¹⁷, 60-65 mg/kg STZ enjeksiyonu ile erkek sıçanlarda oluşturduğu diyabet modellerinde 12 hafta sonunda miyokard tabakasında incelleme gözlemlemiştir¹⁷. Zhu ve ark.¹⁵ ise diyabetik sıçanlar ile yaptığı çalışmasında kalp ağırlığını kontrol grubu ile karşılaştırmış ve sonuçta diyabetik grubun kalp ağırlığının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığını bildirmiştir. Araştırmacıların bildirdiği bu bulgular, bizim istatistiksel araştırmamızda saptadığımız kalp ağırlığının azalmasındaki bulgularımız ile paraleldir. Ayrıca bulgularımızda, kontrol ve diyabetik gruplarda vücut –kalp ağırlıkları arasındaki oran da anlamlı derecede farklı bulunmuştur.

Literatürde diyabetik kardiyomyopatinin nedenini araştıran çeşitli çalışmalara rastlanmıştır. Cai¹⁷, primer kardiyomyopatiden vasküler patolojinin sorumlu olmadığını vurgulamıştır. Afzal ve ark.²¹ ise yaptıkları farmakolojik çalışmalarında, diyabete bağlı olarak kalp kası hücrelerinin sarkoplazmik retikulum-

larında Ca²⁺ATPase aktivitesinin belirgin olarak azaldığını bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızdaki bulgularımız değerlendirildiğinde sarkoplazmik retikulumlarda gözlenen vakuoler değişimin nedeninin diyabete bağlı kalsiyum sinyal yolunda olabilecek bozuklukla ilgili olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak dişi sıçanlarda oluşturulan diyabet modellerinde ventriküler kalp kası hücreleri ultrastrüktürel düzeyde incelendiğinde, 8 haftalık süreçte belirgin organel ve miyoflaman dejenerasyonu varlığı saptanmıştır.

Kaynaklar

1. Hand AR, Weiss RE. Effects of streptozotocin-induced diabetes on the rat parotid gland. *Lab Invest* 1984; 51:429-40.
2. Shaper LM, Howart AP, Calter MM. Left-ventricular function in diabetes mellitus. I. Methodology and prevalence and spectrum of abnormalities. *Br Heart J* 1981; 45: 122-28.
3. Penpragkul S, Schaible T, Yipinstoi T, Scheuer J. The effects of diabetes on performance and metabolism of rat hearts. *Circ Res* 1980; 47: 911-21.
4. Stefek M, Sotnikova R, Okruhlicova L, et al. Effect of dietary supplementation with the pyrdoindole antioxidant stobaline on antioxidant state and ultrastructure of diabetic rat myocardium. *Acta Diabetol* 2000; 37: 111-7.
5. Malone JI, Schocken DD, Morrison AD, Gilbert-Barness. Diabetic cardiomyopathy and carnitine deficiency. *J Diab Comp* 1999; 13: 86-90.
6. Howarth FC, Qureshi MA, Lawrence P, Adeghate E. Chronic effects of streptozotocin-induced diabetes on the ultrastructure of rat ventricular and papillary muscle. *Acta Diabetol* 2000; 37: 119-24.
7. Bell DSH. Diabetic cardiomyopathy: A unique entity or a complication of coronary artery disease? *Diabetes Care* 1995; 18: 708-14.
8. Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannel WB. Morbidity and mortality in diabetes in the Framingham population sixteen year follow-up study. *Diabetes* 1974; 23: 105-11.
9. Hamby RI, Zonereich S, Sherman L. Diabetic cardiomyopathy. *JAMA* 1974; 229: 1749-54.
10. Chatham JC, Forder JR. A 13-C NMR study of glucose oxidation in the intact functioning rat heart following diabetes-induced cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 10: 1203-13.
11. Bhimji S, Godin DV, McNeill JH. Myocardial ultrastructural changes in alloxan-induced diabetes in rabbits. *Acta Anat (Basel)* 1986;125:195-200.
12. Thompson EW. Structural manifestations of diabetic cardiomyopathy in the rat and its reversal by insulin treatment. *Am J Anat* 1988;182:270-82.
13. Balogh I, Koltai MZ, Pogatsa G. Ultrastructural alterations in cardiac and skeletal muscles in experimental diabetes mellitus. *Acta Physiol Hung* 1988;71:219-25.
14. Harackova M, Murphy MG. Effects of chronic diabetes mellitus on the electrical and contractile activities, 45Ca²⁺ transport, fatty acid profiles and ultrastructure of isolated rat ventricular myocytes. *Pflugers Arc* 1988; 411: 564-72.

15. Zhu XX, Zhou XP, Zhong XL, Zhong CS, Yu YF. Streptozotocin induced cardiomyopathy in diabetic rats. *Chin Med J (Engl)* 1993;106:463-6.
16. Seager MJ, Singal PK, Orchard R, Pierce GN, Dhalla NS. Cardiac cell damage: a primary myocardial disease in streptozotocin-induced chronic diabetes. *Br J Exp Path* 1984; 65: 613-23.
17. Cai F. Studies of enzyme histochemistry and ultrastructure of the myocardium in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1989;69:276-8.
18. McGrath GM, McNeill JH. Cardiac ultrastructural changes in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of insulin treatment. *Can J Cardiol* 1986;2:164-9.
19. Okruhlicova L, Sotnikova R, Stefek M, Tribulova N, Weismann P, Gajdosik A, Gajdosikova A. L-arginine reduces structural remodeling in the diabetic rat myocardium. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2002; 24:201-7.
20. Fitzl G, Martin R, Dettmer D, Hermsdorf V, Drews H, Welt K. Protective effects of Ginkgo biloba extract EGb 761 on myocardium of experimentally diabetic rats. I: ultrastructural and biochemical investigation on cardiomyocytes. *Exp Toxicol Pathol* 1999 ;51:189-98.
21. Afzal N, Pierce GN, Elimban V, Beamish RE, Dhalla NS. Influence of verapamil on some subcellular defects in diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol* 1989;256:53-8.