

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**ELLAGİK ASİDİN KARDİYAK HİPERTROFİ  
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ELEKTROFİZYOLOJİK  
OLARAK İNCELENMESİ**

Bilge Eren YAMASAN

DOKTORA TEZİ

2019-ANTALYA

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI**

**ELLAGİK ASİDİN KARDİYAK HİPERTROFİ**  
**ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ELEKTROFİZYOLOJİK**  
**OLARAK İNCELENMESİ**

Bilge Eren YAMASAN

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Semir ÖZDEMİR**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2017-2550 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyofizik Anabilim Dalı Biyofizik Programında  
Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 24/12/2019

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Semir ÖZDEMİR .....  
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Nazmi YARAŞ .....  
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Tammam SİPAHİ .....  
Trakya Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Tefvik GÜLYAŞAR .....  
Trakya Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Murathan KÜÇÜK .....  
Akdeniz Üniversitesi

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

**Prof. Dr. Narin DERİN**

**Enstitü Müdürü**

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci

Bilge Eren YAMASAN

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Semir ÖZDEMİR

İmza

## TEŐEKKÜR

Bu çalıőmanın yapılması için gerekli tüm olanakları sağlayan, doktora eğitimim süresince bilgi birikimini ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Semir ÖZDEMİR'e,

Doktora eğitimim süresince bilgi ve birikimlerini aktaran Akdeniz Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı'nın değerli hocalarına,

Doktora eğitimimi Akdeniz Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalın'da yapmamı sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Tammam ŐİPAHI ve Prof. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR'a,

Bu çalıőmanın gerçekleşmesinde katkı sağlayan ve her aőamasında yardımcı olan sevgili çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Tanju MERCAN ve Araş. Gör. Orhan ERKAN'a,

Teknik olanakları ile bu çalıőmanın belirli basamaklarının gerçekleőmesini sağlayan Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları nitesi çalıőanlarına, Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalıőanlarına ve çalıőmama maddi destek sağlayan Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine,

Hayatım boyunca her konuda yanımda olan, destekleyen, koőulsuz seven ve sevdiğim canım aileme,

Teőekkürü bir borç bilirim.

## ÖZET

**Amaç:** Patolojik kardiyak hipertrofi durumunda meydana gelen kasılma fonksiyonundaki ve kardiyomiyositlerin  $Ca^{2+}$  regülasyonundaki değişikliklere kronik EA uygulamasının bir etkisinin olup olmadığının, ayrıca reaktif oksijen türlerinin (ROT) bu süreçteki olası rollerinin incelenmesi amaçlandı.

**Yöntem:** Kardiyak hipertrofi modeli bir  $\beta$ -AR agonisti olan isoproterenolün (İSO) kronik olarak uygulanmasıyla gerçekleştirildi. 4 haftalık deney süresince İSO ve İSO+EA gruplarına İSO (5 mg/kg) subkutan olarak enjekte edildi. İSO+EA ve K+EA gruplarına EA (20 mg/kg) gavaj yoluyla verildi. Bu sürenin sonunda izole edilen ventrikül miyositlerinin fraksiyonel kısaltmaları, hücre içi  $Ca^{2+}$  transienleri, SR  $Ca^{2+}$  miktarları ve  $Ca^{2+}$  akımları kaydedildi. Proteinlerin ekspresyon seviyeleri western blot yöntemiyle belirlendi ve protein karbonil ölçümü kolorimetrik kit ile yapıldı.

**Bulgular:** İSO grubunda kasılma hızının düştüğü ve genliğinin azaldığı, buna karşılık EA uygulamasıyla kasılmanın genliğinde ve hızında düzelme olduğu görüldü. EA uygulaması diyastolik  $Ca^{2+}$  seviyelerindeki İSO kaynaklı artışı düzeltmenin yanında,  $Ca^{2+}$  transienlerinin genliğindeki azalma ve düşme hızındaki yavaşlamayı da önemli ölçüde iyileştirdi. İSO grubunda azaldığı görülen  $Ca^{2+}$  kanalı akımının EA uygulamasıyla arttığı belirlendi. Protein ekspresyonlarına bakıldığında, İSO grubunda ANP, CaMKII, SERCA ve p-PLB ekspresyonlarının arttığı, EA uygulanmasıyla SERCA dışındaki proteinlerin ekspresyonlarının azaldığı bulundu. Ayrıca İSO uygulamasının Nox2 protein ekspresyonunu değiştirmedığı, ancak, p-22phox ve p-47phox alt birimlerinin protein ekspresyonlarını arttırdığı görüldü. EA uygulamasıyla p-22phox alt birimin ekspresyonunun azaldığı bulundu. Ayrıca EA'nın İSO grubunda artmış olan protein oksidasyonunu da azalttığı görüldü.

**Sonuç:** Bulgular ROT artışının miyositlerde  $Ca^{2+}$  regülasyonunun ve kontraktıl aktivitenin bozulmasına neden olduğunu, buna karşılık kronik EA uygulamasının  $Ca^{2+}$  regülasyonunu düzelterek patolojik kardiyak hipertrofiyle ilişkili fonksiyonel anormallikleri önleyebileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:**  $\beta$ -adrenerjik reseptör, reaktif oksijen türleri, ellagik asit, patolojik kardiyak hipertrofi, hücre içi  $Ca^{2+}$

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to investigate whether chronic EA application has any effect on the changes in contractile function and  $\text{Ca}^{2+}$  regulation of cardiomyocytes in pathologic cardiac hypertrophy and to examine the possible roles of reactive oxygen species (ROS) in this process.

**Method:** The cardiac hypertrophy model was performed by administering isoproterenol (ISO), which is a  $\beta$ -AR agonist. During the 4-week experimental period, ISO (5mg/kg) was injected subcutaneously into the ISO and ISO+EA groups. EA (20 mg/kg) was administered to the ISO+EA and C+EA groups by gavage. At the end of this period, fractional shortening, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  transients, SR  $\text{Ca}^{2+}$  content, and  $\text{Ca}^{2+}$  currents of isolated ventricular myocytes were recorded. Protein expression levels were determined by western blotting method and protein carbonyl was measured by colorimetric assay kit.

**Results:** In the ISO group, the contraction rate and the amplitude of contraction decreased, whereas the EA application improved both the amplitude and rate of the contraction. EA application was not only restored the ISO-induced increase in diastolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels but also significantly improved the decrease in amplitude and decay rate of  $\text{Ca}^{2+}$  transient. The  $\text{Ca}^{2+}$  channel current which decreased in the ISO group was found to be increased with EA application. When the protein expressions were examined, it was found that ANP, CaMKII, SERCA and p-PLB expressions were increased in the ISO group and the expression of proteins other than SERCA was decreased with EA application. In addition, the application of ISO did not alter the expression of Nox2 protein, whereas it significantly increased the expression of p-22phox and p-47phox subunits. The expression of the p-22phox subunit was decreased with the EA application. In addition, EA decreased protein oxidation which was found to be increased in the ISO group.

**Conclusions:** Increased ROS may cause deterioration of  $\text{Ca}^{2+}$  regulation and contractile activity in myocytes, whereas chronic EA administration may prevent  $\text{Ca}^{2+}$  dysregulation and functional abnormalities associated with pathological cardiac hypertrophy.

**Key words:**  $\beta$ -adrenergic receptor, reactive oxygen species, ellagic acid, pathological cardiac hypertrophy, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ÖZET</b>                                                                          | <b>i</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>                                                                      | <b>ii</b> |
| İÇİNDEKİLER                                                                          | iii       |
| TABLolar DİZİNİ                                                                      | v         |
| ŞEKİLLER DİZİNİ                                                                      | vi        |
| SİMGELER ve KISALTMALAR                                                              | vii       |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                                      | <b>1</b>  |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                                                             | <b>3</b>  |
| 2.1. Kalbin Yapısı ve Görevi                                                         | 3         |
| 2.2. Kalpte Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi                                              | 5         |
| 2.3. $\beta$ -Adrenerjik Sinyal Yolağının Uyarılma-Kasılma Çiftlenimindeki Rolü      | 7         |
| 2.4. Kardiyak Hipertrofi                                                             | 11        |
| 2.5. Fizyolojik Kardiyak Hipertrofi                                                  | 12        |
| 2.6. Patolojik Kardiyak Hipertrofi                                                   | 13        |
| 2.7. Kardiyak Hipertrofiye $\beta$ -Adrenerjik Sinyal Yolağının Etkisi               | 15        |
| 2.8. Patolojik Kardiyak Hipertrofi ve Hücre İçi $Ca^{2+}$ Döngüsündeki Değişiklikler | 16        |
| 2.9. L-Tipi $Ca^{2+}$ Kanalındaki Değişiklikler                                      | 17        |
| 2.10. SR $Ca^{2+}$ Regülasyonundaki Değişiklikler                                    | 18        |
| 2.11. Kalpte Reaktif Oksijen Türleri (ROT) ve Sinyal Yolakları                       | 20        |
| 2.12. Antioksidan Savunma Sistem                                                     | 24        |
| 2.13. Ellagik Asidin Antioksidan Özellikleri                                         | 25        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>                                                         | <b>29</b> |



|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1. Deney Gruplarının ve Sürecinin Oluşturulması                           | 29        |
| 3.2. Hücre İzolasyonunun Gerçekleştirilmesi                                 | 29        |
| 3.3. Kasılma Parametrelerinin Ölçümü                                        | 30        |
| 3.4. Hücre İçi Serbest Ca <sup>2+</sup> Derişimi Ölçümü                     | 30        |
| 3.5. SR Ca <sup>2+</sup> İeriğinin Ölçülmesi                                | 31        |
| 3.6. L-tipi Ca <sup>2+</sup> Akımlarının Kaydedilmesi                       | 31        |
| 3.7. Protein Ekspresyonlarının Analizi                                      | 32        |
| 3.8. Protein Karbonil Analizi                                               | 33        |
| 3.9. Kullanılan Kimyasallar                                                 | 34        |
| 3.10. İstatiksel Analiz                                                     | 34        |
| <b>4. BULGULAR</b>                                                          | <b>35</b> |
| 4.1. Deney Hayvanlarının Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri               | 35        |
| 4.2. Kasılma Parametreleri                                                  | 38        |
| 4.3. Hücre İçi Ca <sup>2+</sup> Transientleri                               | 41        |
| 4.4. Ca <sup>2+</sup> Akımları                                              | 44        |
| 4.5. SR Ca <sup>2+</sup> Miktarı                                            | 45        |
| 4.6. Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi ve Protein Karbonil Ölçümü | 47        |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                                          | <b>51</b> |
| <b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>                                                 | <b>60</b> |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                            | <b>62</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                             | <b>75</b> |

## TABLÖLAR DİZİNİ

**Tablo 4. 1.** Deney gruplarının ilk ve son vücut ağırlıkları.

36



## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2. 1. Ventriküler AP ve evrelerinden sorumlu iyonik akımların gösterimi.                                                      | 5  |
| Şekil 2. 2. Kardiyomiyositlerdeki uyarılma-kasılma çiftlenimi.                                                                      | 7  |
| Şekil 2. 3. Kardiyomiyositlerde $\beta 1$ ve $\beta 2$ -AR'ın hücre içi sinyal yolları.                                             | 10 |
| Şekil 2. 4. Hemodinamik aşırı yüklenmeye karşı gelişen kardiyak ve hücreyel yeniden şekillenme.                                     | 15 |
| Şekil 2. 5. ROT'ların uyarılma-kasılma üzerindeki etkisi.                                                                           | 23 |
| Şekil 4. 1. Deney gruplarının 4 haftalık süreçte sağkalım yüzdelerinin değişimi.                                                    | 35 |
| Şekil 4. 2. Ellagik asid uygulamasının kardiyak hipertrofi parametrelerine etkisi.                                                  | 37 |
| Şekil 4. 3. Deney gruplarının ANP protein ekspresyon analizi ve wesetrn blot görüntü örneği.                                        | 38 |
| Şekil 4. 4. Kardiyomiyositlerin elektriksel alan uyarısı altında kaydedilen kasılma parametreleri.                                  | 40 |
| Şekil 4. 5. Kardiyomiyositlerin $Ca^{2+}$ transient parametreleri.                                                                  | 43 |
| Şekil 4. 6. Deney gruplarından elde edilen L-tipi $Ca^{2+}$ akımlarının potansiyele göre değişimi.                                  | 45 |
| Şekil 4. 7. Deney gruplarına uygulanan 10 mM'lık kafeinin oluşturduğu $Ca^{2+}$ transientleri ve SR $Ca^{2+}$ yükü.                 | 46 |
| Şekil 4. 8. Deney grupları için $Ca^{2+}$ düzenleyici proteinlerin western blot görüntü örnekleri ve protein ekspresyon analizleri. | 48 |
| Şekil 4. 9. Deney grupların oksidatif stress parametreleri.                                                                         | 50 |

## SİMGELER ve KISALTMALAR

|                              |                                                      |
|------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>AC</b>                    | : Adenilil Siklaz                                    |
| <b>ANP</b>                   | : Atriyal Natriüretik Peptid                         |
| <b>AP</b>                    | : Aksiyon Potansiyeli                                |
| <b>AR</b>                    | : Adrenerjik Reseptör                                |
| <b>ATP</b>                   | : Adenozin Trifosfat                                 |
| <b>AV</b>                    | : Atriyoventrikül                                    |
| <b><math>\beta</math>-AR</b> | : $\beta$ -Adrenerjik Reseptör                       |
| <b>CaM</b>                   | : Kalmodulin                                         |
| <b>CaMKII</b>                | : $Ca^{2+}$ /Kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz II     |
| <b>cAMP</b>                  | : Siklik Adenozin Mono Fosfat                        |
| <b>DPPH</b>                  | : 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil                       |
| <b>EA</b>                    | : Ellagik Asit                                       |
| <b>GDP</b>                   | : Guanosin Difosfat                                  |
| <b>GPCR</b>                  | : G protein Bağlı Reseptör                           |
| <b>GRK</b>                   | : G protein Bağlı Reseptör Kinaz                     |
| <b>GTP</b>                   | : Guanosin Trifosfat                                 |
| <b><math>I_{to}</math></b>   | : Geçici Dışarı Doğru $K^+$ Akımı                    |
| <b>I-1</b>                   | : İnhibitör-1                                        |
| <b>İSO</b>                   | : İsoproterenol                                      |
| <b>L-NAME</b>                | : $N\omega$ -Nitro-L-Arginin Metil Ester Hidroklorür |
| <b>MyBP-C</b>                | : Miyozin Bağlayan Protein C                         |
| <b>NADPH</b>                 | : Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat              |
| <b>NCX</b>                   | : $Na^+$ / $Ca^{2+}$ Değiştokuşçusu                  |
| <b>NO</b>                    | : Nitrik Oksid                                       |

|              |                                                |
|--------------|------------------------------------------------|
| <b>PDE</b>   | : Fosfodiesteraz                               |
| <b>PKA</b>   | : Protein Kinaz A                              |
| <b>PLB</b>   | : Fosfolamban                                  |
| <b>PP1</b>   | : Protein Fosfataz-1                           |
| <b>PP2A</b>  | : Protein Fosfataz-2A                          |
| <b>ROT</b>   | : Reaktif Oksijen Türleri                      |
| <b>RyR</b>   | : Riyanodin Reseptörü                          |
| <b>SA</b>    | : Sinoatriyal                                  |
| <b>SERCA</b> | : Sarko/Endoplazmik Retikulum $Ca^{2+}$ -ATPaz |
| <b>SR</b>    | : Sarkoplazmik Retikulum                       |

## 1. GİRİŞ

Kalp dolaşım sisteminin merkezidir. Bu nedenle hem normal koşullarda hem de stres koşulları altında doku ve organlara perfüzyonu sağlaması gerekir. Kalp farklı koşullar altında kardiyak debisini korumak için sürekli bir düzenleme altındadır. Bunu da parasempatik ve sempatik sinir sisteminin yardımıyla gerçekleştirir (Bers, 2002; Baker, 2014). Parasempatik sistem asetilkolin sayesinde ventrikül kardiyomiyositleri ve sinoatriyal (SA) nodu hücreleri üzerindeki etkisiyle kalp atım hızını düşürerek kardiyak debiyi azaltır. Daha fazla kardiyak debiye ihtiyaç duyulduğunda ise sempatik sinir sistemi aktif hale gelir ve katekolaminler aracılığıyla kalp hızında, kasılmada ve relaksasyon hızında artışa neden olur. Böylece kardiyak debiyi artırır (Najafi ve ark., 2016). Kalbin kasılma kuvvetinin azalması ya da kasılma ve gevşeme hızlarında düşme olması durumunda kardiyak debide azalma gerçekleşir. Azalan kardiyak fonksiyonunun erken evresinde sempatik sinir sisteminin aktivitesindeki artış kardiyak debiyi korur. Kardiyak fonksiyon daha da kötüleştikçe, ilerleyen kardiyak fonksiyon kaybını telafi etmek için sempatik sistem aktivitesi de artacaktır. Ancak sempatik sinir sisteminin aktivitesinin aşırı artışı sonucunda dolaşımdaki katekolamin seviyelerinin yükselmesi ve  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin ( $\beta$ -AR) kronik uyarılması kardiyomiyosit apoptozunu indükler ve kalbin hipertrofi ile ilişkili patolojik yeniden şekillenmesine neden olur (Port ve Bristow, 2001; Ma ve ark., 2011). Artmış kardiyak sempatik sinir aktivitesi, patolojik kardiyak hipertrofiye sahip olan hastaların baskın bir özelliğidir ve  $\beta$ -AR'lerin nörohormonal yolak tarafından uzun süreli uyarılmasının hem hayvan modellerinde hem de insanlarda kalp yetmezliği ve mortalitenin artmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Goldspink ve ark., 2004; Filgueiras-Rama, 2018). Fizyolojik koşullarda kasılma ve gevşeme periyodunun sürekli olarak gerçekleşmesi uyarılma-kasılma çiftlenimi ile sağlanır. Uyarılma-kasılma çiftlenimi, elektriksel uyarı ile başlayıp kardiyomiyositlerin kasılması ve gevşemesiyle biten bir süreçtir.  $Ca^{2+}$  döngüsü bu süreç için kritik öneme sahiptir ve  $Ca^{2+}$  transiyentinin büyüklüğü kasılmanın önemli bir belirleyicisidir (Fischer ve ark., 2013; Marks, 2013). Ayrıca uyarılma-kasılma çiftlenimi sempatik sinir sisteminin  $\beta$ -AR sinyal yolağı tarafından da düzenlenir. Katekolaminlerin  $\beta$ -AR'lara bağlanması adenilil siklazın (AC) uyarımı sonrası siklik adenozin mono fosfat (cAMP) üretimi ve protein kinaz A (PKA)'nın aktivasyonu ile sonuçlanır. Aktive olan PKA uyarılma-kasılma çiftleniminde önemli rolleri olan düzenleyici proteinleri fosforile eder. Bu fosforilasyon miyokardiyumda

pozitif inotropik, kronotropik ve lusitropik etkilere neden olur (Wang ve ark., 2018). Sempatik sinir sisteminin kronik aktivitesi  $\beta$ -AR sinyal yolağının bozulmasına, reaktif oksijen türlerinin (ROT) miktarının aşırı artmasına ve oksidatif stresin oluşmasına neden olur. Bunun sonucunda iyon kanalları ve protein kinazlar gibi düzenleyici proteinlerin aktivitelerinin ve işlevlerinin değişmesi ve uyarılma-kasılma çiftleniminin işleyişinin bozulması meydana gelir. Böylece hücre içi bazal  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu yükselir,  $Ca^{2+}$  transient genliği azalır ve süresi uzar. Sarkoplazmik retikulum (SR)'dan  $Ca^{2+}$  sızıntısının artması ve azalan SR  $Ca^{2+}$  geri alımı nedeniyle SR  $Ca^{2+}$  içeriğinin azalmasının sonucunda  $Ca^{2+}$  kullanımında değişiklikler görülür. Bu durum hücre içi  $Ca^{2+}$  dengesinin bozulmasına neden olur (Lipskaia ve ark., 2007; Santos ve ark., 2016; Hartupee ve Mann, 2017). Sempatik sinir aktivitesi ve dolaşımdaki katekolamin seviyelerinin yükselmesi sonucunda  $\beta$ -AR'ların sürekli uyarımı nedeniyle oluşan oksidatif stres kardiyomiyositlerde hipertrofi, fibroz, apoptoz ve kardiyak yeniden şekillenmesi sürecine katkıda bulunur (Ma ve ark., 2011). Fiziyojik koşullar altında serbest radikal oluşumu ile antioksidan mekanizmaların bu oksidanları ortamdan uzaklaştırma kapasitesi denge halindedir. Ancak patolojik koşullar altında bu dengenin oksidanlara kayması oksidatif stresin oluşmasına neden olur. Bu durumu durdurmak ve/veya geri çevirmek oksidan miktarını azaltan ve dengelenmesini sağlayan hücrel antioksidan mekanizmalarıyla veya dışardan alınan kimyasal bileşiklerle sağlanabilir. Ellagik asit (EA) de bu türden etkileri olan bir antioksidan bileşiktir. Yapılan birçok çalışmada EA'nın kardiyoprotektif etkisinin olduğu ve bunun da antioksidan özelliğinden kaynaklandığı vurgulanmaktadır (Namekata ve ark., 2013; Dianat ve ark., 2015; Hemmati ve ark., 2018). Bu çalışmalar EA içeren diyetlerin kullanımının kardiyovasküler hastalıkların oluşmasının önlenmesinde ve/veya tedavisinde önemli olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda, i) bir  $\beta$ -AR agonisti olan isoproterenol (İSO) kullanılarak oluşturulan kardiyak hipertrofi durumunda meydana gelen kasılma fonksiyonundaki bozulmanın, kardiyomiyositlerde oluşan  $Ca^{2+}$  regülasyonundaki değişikliklerden kaynaklanıp kaynaklanmadığının ortaya konması ve ii) kalbin kontraktıl aktivitesindeki ve  $Ca^{2+}$  regülasyonundaki değişikliklere kronik EA uygulamasının bir etkisinin olup olmadığının, ROT'ların bu süreçlerdeki olası rolleri de incelenerek araştırılması hedeflenmiştir. Özetle projemiz sonucunda temel olarak patolojik kardiyak hipertrofi modelinde EA uygulamasının kardiyoprotektif bir etkiye sahip olup olmadığının moleküler mekanizmalarıyla birlikte kapsamlı bir şekilde gösterilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kalbin Yapısı ve Görevi

Kalp, sistemik ve pulmoner dolaşıma kan pompalamaktan sorumlu ağırlıklı olarak kas hücrelerinden oluşan, sağ ve solda yer alan iki atriyum ve iki ventrikül olmak üzere 4 odacıktan oluşan bir organdır. Kalp bu pompalama işlemi ile diğer dokulara ve organlara besinlerin yeterli bir şekilde taşınmasını, atık ürünlerin uzaklaştırılmasını, gaz değişimini ve hormonların etkin yerlerine ulaşmasını sağlar. Böylece vücudun ihtiyacını yerine getirmek için sürekli bir çaba sarf eder (Grunnet, 2010). Kalbin kanı pompalama işleminin gerçekleşmesi, yani kasılması kardiyak aksiyon potansiyeli (AP) diye bilinen elektriksel sinyalin iletimiyle tetiklenmektedir. Kalpte uyarı sağ atriyumun arka üst duvarında bulunan SA düğümünde başlar. SA hücrelerinde oluşan AP internodal yollar aracılığıyla atriyum boyunca yayılır ve atriyum hücrelerini depolarize ederek bu bölgedeki hücrelerin kasılmasını sağlar. Böylece atriyumlarda bulunan kan ventriküllere pompalanır. Daha sonra uyarı triküspid kapağın arkasında bulunan atriyoventriküler (AV) düğümüne gelir burada 0.16 s kadar bekledikten sonra His demeti ve Purkinje lifleri boyunca yayılarak ventrikül hücrelerini depolarize eder ve ventrikül hücrelerinin kasılması sağlanır. Böylece kan eş zamanlı olarak pulmoner ve sistemik dolaşıma pompalanır (Pinnell ve ark., 2007; Bartos ve ark., 2015). SA hücrelerinden başlayan AP'nin atriyum ve ventrikül hücrelerine iletilmesi gedik kavşakları (gap-junction) aracılığıyla gerçekleşmektedir. Gedik kavşak, iki hücre arasında bulunan ve bu hücrelerin sitozollerinin birbirine karışmasına izin veren bir kanaldır. Bu şekilde iyonlar bir hücreden diğer hücreye kolayca geçebilir ve hücrelerin elektriksel olarak bağlantısı sağlanır. Böylece bir hücrede başlayan AP komşu hücrede yeni bir AP başlatarak yayılır ve bu bağlantı ile kalbin elektriksel aktivitesinin senkronize edilmesi sağlanır (Kanno ve Saffitz, 2001; Santana ve ark., 2010).

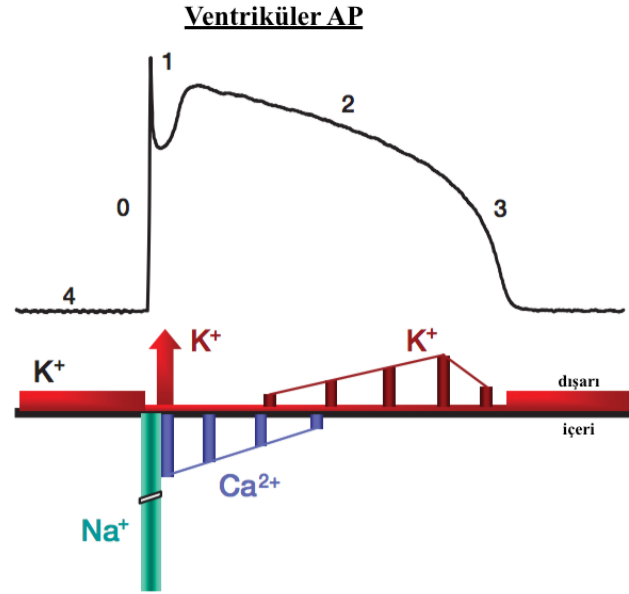
AP'nin şekli ve süresi canlı türüne, kalbin bölgesine, kalp atış hızına, nörohormonal duruma göre farklılık göstermektedir. Kalbin ventrikül hücrelerinde oluşan AP'nin süresi insanlarda 250-300 ms arasındadır ve beş fazdan (fazlar 0-4) oluşmaktadır (Cooper ve ark., 2010). AP'nin her bir fazı çeşitli iyon kanallarının sıralı aktivasyonundan kaynaklanan membran potansiyelindeki değişime göre oluşmaktadır. Genel olarak, AP hücrenin depolarizasyonu ile başlar ve repolarizasyonla sonlanır. Depolarizasyon sırasında membran potansiyeli (-70 ile -90 mV) negatif değerinden



pozitif değerlere (+20 veya +30 mV) ıkar daha sonra repolarizasyon sürecinde tekrar dinlenim membran potansiyeline geri döner. Bununla birlikte ventrikül hücrelerinde uzun bir plato evresi vardır (Grant, 2009; MacLeod ve ark., 2010).

AP'nin evrelerinden sorumlu olan iyon kanalları ve akımları incelendiğinde; faz 0, hızlı sıçrama depolarizasyon evresidir. Bu evrede gedik kavşaklar aracılığıyla diğer hücreden gelen depolarizasyon dalgasının sarkolemma ve t-tübülleri boyunca yayılarak voltaja bağlı  $\text{Na}^+$  kanallarının açılmasına ve  $\text{Na}^+$  iyonlarının hücre içerisine girmesine neden olur. Böylece membran potansiyeli dinlenim potansiyelinden daha pozitif değerlere gelir. Depolarizasyon sırasında aktive olup açılan  $\text{Na}^+$  kanalları 1-2 ms içerisinde  $\text{Na}^+$  iyonlarının hücre içerisine geçişine izin verir ve daha sonra inaktivasyon durumuna geçerler. İnaktive olan  $\text{Na}^+$  kanalları hücrenin repolarizasyonuna kadar tekrar açılmaz. Bu durumda başka bir uyarıcının yeni bir AP oluşturmasına izin vermez (Walker ve Spinale, 1999; Nerbonne ve Kass, 2005; Grant, 2009). Faz 1, erken repolarizasyon evresidir. Bu evre, inaktivasyondan dolayı depolarize eden içeri doğru  $\text{Na}^+$  akımının sonlanması ve geçici dışarı doğru  $\text{K}^+$  ( $\text{I}_{\text{to}}$ ) ve  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  değiştokuşçusu (NCX) akımlarının eş zamanlı aktivasyonu ile üretilir. Bu evreden esas sorumlu olan  $\text{I}_{\text{to}}$  hızlı aktive olup 30-40 ms içerisinde inaktive olmaktadır (Niwa ve Nerbonne, 2010). Erken repolarizasyon evresinden hemen sonra gerçekleşen Faz 2 evresi, membran potansiyelinin çok az değiştiği AP'nin plato fazıdır. Bu palto fazı yaklaşık 100 ms kadar sürer. Ventrikül AP'de görülen plato evresi diğer hücrelerin AP'lerinden ayıran bir özelliktir. Plato fazında görülen bu sabit membran potansiyelinin nedeni hücre içerisine giren akımlarla hücre dışına çıkan akımların dengede olmasıdır. Plato fazının oluşmasından sorumlu olan içeri doğru akımlar arasında gecikmiş  $\text{Na}^+$  akımları olarak adlandırılan faz 0 aşaması sonunda tamamen inaktif olmayan kanalların oluşturduğu  $\text{Na}^+$  akımı ve L-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  kanalları boyunca  $\text{Ca}^{2+}$  girişi ile oluşan  $\text{Ca}^{2+}$  akımıdır. Hücre dışına doğru akım ise  $\text{K}^+$  kanallarından kaynaklanmaktadır. Plato evresinin ilk kısmında  $\text{I}_{\text{to}}$  görülürken evrenin son kısımlarına doğru gecikmiş doğrultucu  $\text{K}^+$  kanalları olarak bilinen yavaş aktive olan kanalların oluşturduğu  $\text{K}^+$  akımı görülür (Tamargo ve ark., 2004; Cutler ve ark., 2011). Plato fazının sonrasında repolarizasyon olarak adlandırılan faz 3 gerçekleşmektedir. Faz 3 evresi sırasında L-tipi  $\text{Ca}^{2+}$  ve gecikmiş  $\text{Na}^+$  kanallarının inaktivasyonu nedeniyle hücre içerisine doğru akım azalır. Yavaş aktive olan  $\text{K}^+$  kanallarının oluşturduğu gecikmiş doğrultucu  $\text{K}^+$  akımları baskın hale gelir. Böylece  $\text{K}^+$  akımlarının aktivitesi

repolarizasyonu hızlandırır. Gecikmiş doğrultucu  $K^+$  akımının ultra hızlı ( $I_{Kur}$ ), hızlı ( $I_{Kr}$ ) ve yavaş ( $I_{Ks}$ ) olmak üzere üç tipi vardır. Repolarizasyon evresinin sonlarına doğru gecikmiş doğrultucu  $K^+$  kanalları kapanmasıyla  $I_{Kr}$  ve  $I_{Ks}$  akımları azalır ve içeri doğrultucu  $K^+$  kanallarının oluşturduğu  $I_{K1}$  akımı baskın hale gelir. Böylece membran potansiyeli  $K^+$  denge potansiyeline doğru hareket eder (Tristani-Firouzi ve ark., 2001; Chen ve ark., 2016). AP'nin son evresi olan faz 4, ventrikül miyositlerinin dinlenme membran potansiyeline geri döndüğü evredir. Dinlenme durumunda ventrikül miyositlerin membranı hemen hemen yalnızca  $K^+$  iyonu için geçirgendir. Bu nedenle dinlenme membran potansiyeli  $K^+$  denge potansiyeline yakındır. Dinlenme membran potansiyelini bu evrede baskın olan içeri doğrultucu  $K^+$  kanallarının oluşturduğu  $I_{K1}$  akımı tarafından belirlenir. Ayrıca bu evrede  $Na^+/K^+$  pompası ve  $Ca^{2+}$  pompası yardımıyla iyonik dengeyi sağlayarak membranın dinlenme potansiyeline gelmesi sağlanır (Varro ve Papp, 1992). Ventriküler AP'nin fazları ve iyonik akımları Şekil 2.1'de gösterildi.



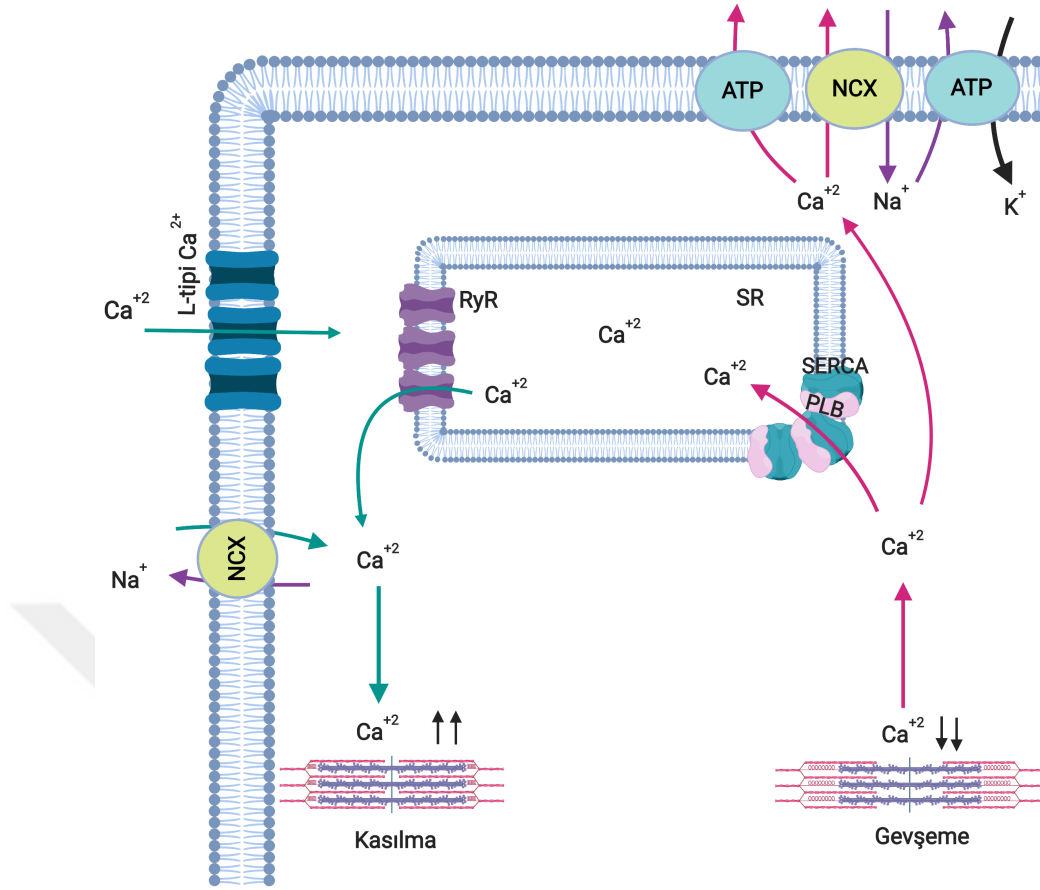
**Şekil 2. 1.** Ventriküler AP ve evrelerinden sorumlu iyonik akımların gösterimi.  $K^+$  akımı ( $I_{K1}$ ), 4. evrenin ana sorumlu akımıdır ve miyositin dinlenme membran potansiyelini belirler. Hızlı depolarizasyon evresi (Faz 0),  $Na^+$  akımı sonucunda oluşur. Erken repolarizasyon evresi (Faz 1),  $I_{to}$  aktive olmasıyla  $Na^+$  akımının azalması sonucu oluşur. Plato evresi (Faz 2), repolarize edici  $K^+$  akımları ile  $Ca^{2+}$  akımının dengesiyle oluşur. Repolarizasyon evresi (Faz 3),  $K^+$  akımları ( $I_{Kr}$  ve  $I_{Ks}$ ) sonucunda oluşur (Tomaselli, 2010).

## 2.2. Kalpte Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi

Kalp kasılması ve miyofilament aktivasyonu, hücre içindeki  $Ca^{2+}$  iyonları tarafından gerçekleştirilir. Bu yüzden hücre içi  $Ca^{2+}$  akışının düzenlenmesi kalp fonksiyonu için kritik öneme sahiptir. Uyarılma-kasılma çiftlenimi, miyositin elektriksel uyarımı ile

hücre içi serbest  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunda artışa ve sitozolde aktin-miyozin etkileşimi ile kasılmaya neden olan bir süreçtir (Şekil 2.2) (Bers, 2002). İlk olarak, SA düğümün pacemaker hücrelerinde oluşan AP, gedik kavşaklar aracılığıyla kasılma hücrelerine aktarılır. Hücre membranı boyunca yayılan AP, t-tübüllerinde yer alan voltaja bağlı L-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının açılmasını tetikleyerek, az miktarda  $Ca^{2+}$ 'un kardiyomiyosit içerisine girmesine neden olur. Bu  $Ca^{2+}$  girişi, SR üzerinde bulunan ryanodin reseptörü (RyR) ile etkileşime girer ve SR'dan hücre içerisine daha büyük miktarda  $Ca^{2+}$  salımını tetikler. Bu işlem,  $Ca^{2+}$ -indüklü  $Ca^{2+}$  salımı olarak bilinir.  $Ca^{2+}$  iyonlarının sarkomerdeki troponin C'ye bağlanmasıyla birlikte tropomiyozin kompleksi aktinin bağlanma bölgesinden ayrılır. Böylece, miyozin başı aktin filamentine bağlanabilir. Miyozin başı aktin filamentini sarkomerin merkezine doğru çekerek kasılmaya neden olur. Kısacası, hücre içi  $Ca^{2+}$  seviyesi kasılma sırasında 100 nM civarındaki diyastolik değerinden 1  $\mu M$ 'lık sistolik değere yükselerek miyofilamentlerin aktive olmasına ve kasılmanın tetiklenmesine neden olur (Bers, 2004; Eisner ve ark., 2017).

Gevşemenin gerçekleşmesi için  $Ca^{2+}$  iyonlarının sitozolden uzaklaştırılması gerekir. Sistolik dönemde sitozoldeki konsantrasyonu artmış olan  $Ca^{2+}$  iyonları hücre içinden birkaç farklı yoldan uzaklaştırılır.  $Ca^{2+}$  iyonlarının yaklaşık %70'i, aktivitesi PLB tarafından düzenlenen SR  $Ca^{2+}$  ATPaz (SERCA) aracılığıyla SR'a tekrar geri alınır.  $Ca^{2+}$  iyonlarının yaklaşık %28'i ise elektrojenik NCX aracılığıyla hücre dışına pompalanmaktadır. Son olarak,  $Ca^{2+}$  iyonlarının yaklaşık %2'sinin bir kısmı  $Ca^{2+}$  ATPaz pompası ile diğer kısmı ise mitokondri  $Ca^{2+}$  uniporter ile uzaklaştırılır. Böylece  $Ca^{2+}$  troponin C'den ayrılır ve miyosit dinlenim haline geri döner (Maier, 2012).



**Şekil 2. 2.** Kardiyomiyositlerdeki uyarılma-kasılma çiftlenimi. Miyokardiyal depolarizasyondan hemen sonra  $Ca^{2+}$  salınımı gerçekleşir. Şeklin sol tarafındaki olaylar kardiyak AP sırasındaki  $Ca^{2+}$  salınımını, şeklin sağ tarafındaki olaylar bir sonraki AP başlayana kadar hücre içerisinde  $Ca^{2+}$  uzaklaştırılmasını göstermektedir. Miyokardiyal kasılmaya neden olan  $Ca^{2+}$ 'un büyük çoğunluğu SR'dan salınır.

### 2.3. $\beta$ -Adrenerjik Sinyal Yolağının Uyarılma-Kasılma Çiftlenimindeki Rolü

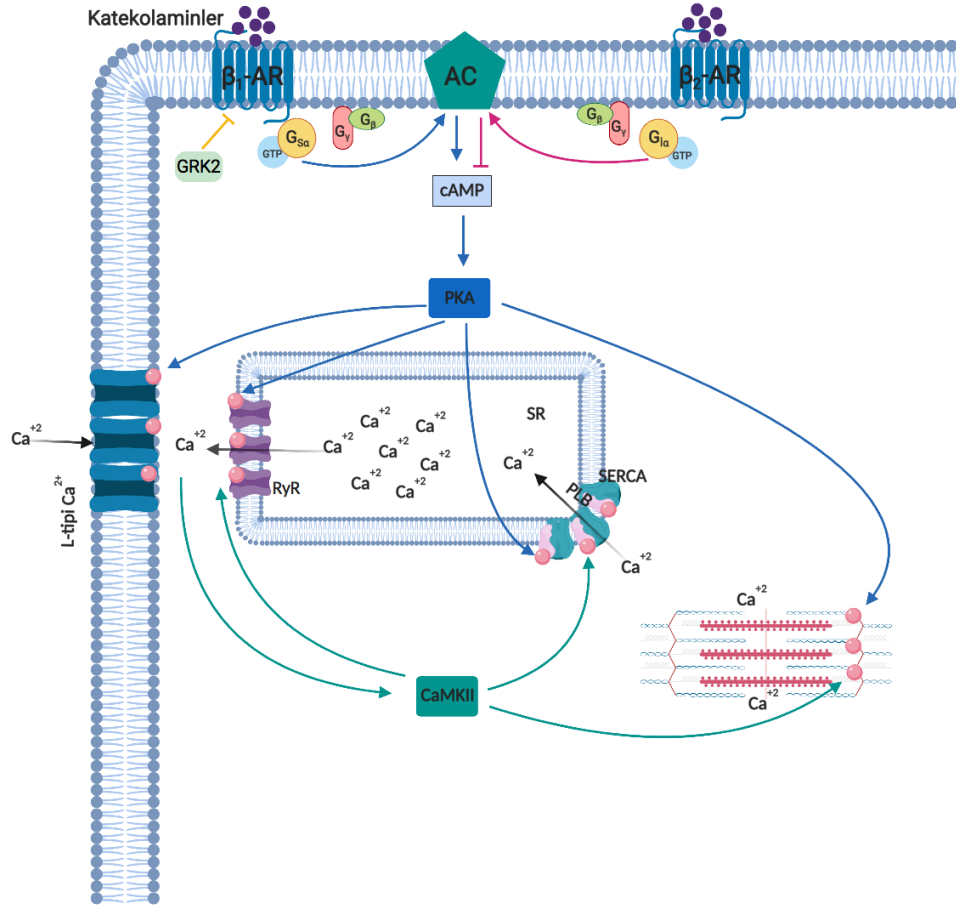
Otonom sinir sistemi, sempatik ve parasempatik olmak üzere ikiye ayrılır. Sempatik sinir sistemi, aralarında kardiyak fonksiyonu da bulunan çok sayıda homeostatik mekanizmanın düzenlenmesinde rol oynar. Sempatik sinir sisteminin temel fonksiyonu “savaş ya da kaç” yanıtını uyarmaktır. Sempatik sinir sistemi uyarımı sonucunda kalp hızında, kasılma ve relaksasyon hızında artış meydana gelir. Kardiyak fonksiyondaki bu değişiklikler dolaşımdaki katekolaminlerin kalpteki adrenerjik reseptörlere (AR) bağlanmasıyla ortaya çıkar. Böylece AR'ler, sempatik sinir sistemi ile kardiyovasküler sistemi birbirine bağlar ve miyokard fonksiyonun düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Port ve Bristow, 2001). AR'ler, kardiyomiyositlerin hücre yüzeyinde yer alır ve G protein bağlı reseptör (GPCR) süper ailesinin üyesidirler. AR'ler, hücre dışı amino terminaline, hücre içi karboksil terminali ile üç hücre dışı ve üç hücre içi ilmekle birbirine bağlanan yedi adet transmembran alfa sarmalına sahip bir yapıdır (Xiang ve Kobilka, 2003). Miyokardiyumda, üç tür  $\beta$ -AR ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  ve  $\beta_3$ ) ve

üç tür  $\alpha$ -AR ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  ve  $\alpha_3$ ) olmak üzere en az altı adet AR alt birimi eksprese olmaktadır. Sağlıklı miyokardiyumda en baskın olan adrenerjik reseptör  $\beta_1$ -AR alt birimidir. Miyokardiyumdaki toplam  $\beta$ -AR'lerin %75-80'ni  $\beta_1$ -AR, %15-18'ni  $\beta_2$ -AR ve geri kalan %2-3'nü  $\beta_3$ -AR oluşturmaktadır. Kalpte  $\beta$ -AR'lerin temel rolü, kasılma ve kalp hızını düzenlemektir.  $\beta_1$ -AR'lerin uyarımı, miyositlerde pozitif inotropik ve lusitropik etkilere neden olur ve bu etkisini AC/cAMP/PKA sinyal yolağı ile gerçekleştirir (Lympelopoulos ve ark., 2013). Sempatik sinir sisteminden salınan nörotransmitterlerin GPCR'lere bağlanması konformasyonel değişikliğe neden olur ve GPCR'lere heterotrimerik G proteinleri bağlanır. G proteinleri alfa, beta ve gama alt birimlerinden oluşmaktadır. G proteinlerinin  $\beta_1$ -AR'ye bağlanması, G-proteinine bağlı guanosin difosfatın (GDP) guanosin trifosfata (GTP) dönüşmesine neden olur. G protein aşağı akış sinyallenmesine aracılık etmek üzere  $G_\alpha$  ve  $G_{\beta\gamma}$  altbirimleri birbirinden ayırır.  $G_\alpha$  altbirimi aminoasit dizisine ve fonksiyonuna bağlı olarak,  $G_{\alpha_s}$ ,  $G_{\alpha_i}$ ,  $G_{\alpha_q}$  ve  $G_{\alpha_{12}}$  olmak üzere dört alt aileye ayrılır (Madamanchi, 2007).  $G_{\alpha_s}$  altbirimi, AC'nin aktivasyonuna yol açar. Bu durum adenozin trifosfatın (ATP) cAMP'ye dönüşümünü katalize eder. İkincil habercil olan cAMP'deki artış, PKA'nın düzenleyici altbirimlerine bağlanarak aktivasyonunu tetikler. Aktive olan PKA, uyarılma-kasılma çiftleniminde gerekli olan birçok proteini fosforile eder. Bu proteinler, L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalı, RyR, fosfolamban (PLB) ve sarkomerik proteinler olan troponin I ve miyozin bağlayan protein C'dir (MyBP-C).  $\beta_1$ -AR'lerin uyarılması sonrasında, L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalının  $\alpha$  altbirimi üzerindeki Ser1928 ve  $\beta$  altbirimi üzerindeki Ser478 ve Ser479 rezidülerinin PKA tarafından fosforilasyonu L-tipi  $Ca^{2+}$  akımında artışa neden olur. PKA aracılı fosforilasyon, L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalının açılma olasılığını ( $P_o$ ) artırır ve voltaja bağlı aktivasyonunu daha negatif bir potansiyele kaydırır. Bu durum AP sırasında, hücre içine giren  $Ca^{2+}$  iyonunu 2 ile 4 kat artırır ve bunun sonucunda SR'dan daha büyük miktarda  $Ca^{2+}$  salınmasına ve  $Ca^{2+}$  transient genliğinin artmasına neden olur. PKA, RyR'nin Ser2808 ve Ser2030 rezidülerini de fosforile eder. L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalından gelen  $Ca^{2+}$  iyonuna karşı aktivasyon duyarlılığını artırır. Böylece SR'dan  $Ca^{2+}$  salınımını artırarak hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunu artırır. Sonuç olarak, PKA'nın inotropik etkisine L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalı ve RyR'lerin fosforilasyonu aracılık eder ve bu hem  $Ca^{2+}$  akımının artmasına hem de SR'dan daha fazla miktarda  $Ca^{2+}$  salınmasına yol açmaktadır. Sistol durumunda, sarkomer kasılması için daha büyük miktarda  $Ca^{2+}$  iyonu sağlanmış olur. PKA'nın lusitropik

etkisine troponin I ve MyBP-C'lerin fosforilasyonu aracılık eder. Bu fosforilasyon sarkomerik miyofilamentlerin  $Ca^{2+}$ 'a duyarlılığını azaltır ve  $Ca^{2+}$ 'un miyofilamentlerden ayrışmasını hızlandırır. Ayrıca, PLB'nin Ser16 rezidülerinin PKA aracılı fosforilasyonu, PLB'nin SERCA pompasına uyguladığı inhibitör etkiyi azaltır. Bu durumda, SERCA aktivitesinin artmasıyla SR içerisine  $Ca^{2+}$  geri alım hızı 2-3 kat artar. Böylece hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu hızlı bir şekilde azalır ve kasılma sonlandırılır (Lissandron ve Zaccolo, 2006).

$\beta_1$ -AR'ler gibi,  $\beta_2$ -AR'lerin aktivasyonu da  $G_s/AC/PKA$  sinyal yolağı aracılığı ile miyositlerde pozitif inotropik yanıtı indükler. Ancak ventrikülde,  $\beta_2$ -AR'lerin uyarımı daha fazla AC aktivasyonuna neden olmakla birlikte maksimum kasılmayı indükleyemez. Bunun nedeni,  $\beta_1$ -AR'lerin uyarılması sonucunda artan cAMP seviyesinin hücre içerisinde global olarak yayılması ve böylece uyarılma-kasılma çiftleniminde gerekli olan proteinleri fosforile etmesidir.  $\beta_2$ -AR'lerin uyarılması sonucunda ise cAMP seviyelerinde lokal bir artış meydana gelir ve bu durumda uzaktaki hedeflerin tümünü fosforile edemez (Cros ve Brette, 2013).  $\beta_2$ -AR'ye sadece  $G_s$  değil aynı zamanda inhibitor G proteini ( $G_i$ ) de bağlanır. Uyarı sonucunda,  $G_{\alpha i}$  alt birimi birçok fosfodiesterazı (PDE) aktive eder. PDE'ler, cAMP'yi hidrolize ederek, AC aracılı sinyal yolağının inhibisyonunu gerçekleştirirler ve böylece inotropik etkileri sınırlandırır.

$\beta$ -AR aktivasyonu sonrasında artan hücre içerisindeki  $Ca^{2+}$  seviyesi  $Ca^{2+}$ /kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII)'yi de aktive eder. CaMKII de PKA gibi birçok  $Ca^{2+}$  düzenleyici proteini fosforile eder. Bu düzenleyici proteinler arasında yer alan L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalının  $\alpha$  altbirimi üzerindeki Ser1512 ve Ser1570 veya  $\beta$  altbirimi üzerindeki Thr498 rezidülerini fosforile ederek  $Ca^{2+}$  akımında artışa neden olur. RyR üzerindeki CaMKII'nin fosforilasyon bölgesinin yeri Ser2815 rezidüsüdür. CaMKII, RyR'nin açık olma olasılığını arttırarak hücre içerisine fazla miktarda  $Ca^{2+}$  salınmasına neden olur. CaMKII, PLB'nin Thr17 alanını da fosforile ederek, SR'a  $Ca^{2+}$  geri alımını hızlandırır ve böylece SR  $Ca^{2+}$  yükünü arttırmış olur (Grimm ve Brown, 2010).



**Şekil 2. 3.** Kardiyomiyositlerde  $\beta_1$  ve  $\beta_2$ -AR'nin hücre içi sinyal yolları.  $\beta_1$  ve  $\beta_2$ -AR'lar  $G_s$  yoluyla katekolaminlerin kronotropik ve inotropik etkilerine aracılık eder. Bununla birlikte  $\beta_2$ -AR'lar kardiyomiyositlerde antiapoptotik etkilere neden olan  $G_i$ 'ye bağlanır.  $\beta$ -AR aktivasyonu, L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalı, RyR ve PLB'nin PKA veya CaMKII yoluyla fosforilasyona neden olarak uyarılma-kasılma çiftleniminin kazancını artırır.

Normal koşullar altında,  $\beta$ -AR aktivasyon sinyalinin sonlandırılması çeşitli adımlarda gerçekleştirilir. Sinyalin aktivasyon ve deaktivasyon dengesi normal hücre fonksiyonları için kritik öneme sahiptir. Sinyali sonlandırmak için,  $\beta$ -AR aktivasyonu sonucunda hücre içerisinde artan cAMP'ler GPCR kinazları (GRK) aktive ederler. GRK'ler sadece agonistle aktive olmuş  $\beta$ -AR'leri fosforile ederler. Bu fosforilasyon  $\beta$ -arrestinler için bir bağlanma bölgesi oluşturur.  $\beta$ -arrestinler, ikincil habercilerin parçalanmasına katılan PDE'ler ve diacylglycerol kinazlarla birlikte sinyali sonlandırabilirler (de Lucia ve ark., 2018). Böylece  $\beta$ -AR'lerin katekolaminler tarafından gerçekleştirilen adrenerjik uyarıya yanıtının azalmasına neden olurlar. Bu durum homolog duyarsızlaşma olarak bilinmektedir.  $\beta$ -AR aracılı gerçekleşen fizyolojik çok sayıda süreç nedeniyle, GRK'ler kardiyovasküler homeostazın korunmasında çok önemlidir.

PKA'yı aktif hale getiren cAMP gibi ikincil haberciler  $\beta$ -AR'leri fosforile ederek agonist uyarımından bağımsız duyarsızlaşmaya neden olur. Bu durum heterolog duyarsızlaşma olarak bilinmektedir (Salazar ve ark., 2007). Ayrıca PKA,  $\beta$ -AR'leri doğrudan fosforile ederek G proteinlerin reseptörden ayrılmasına neden olur. Homolog duyarsızlaşmadan farklı olarak, heterolog duyarsızlaşmada hem uyarılmış hem de uyarılmamış  $\beta$ -AR'ler fosforile edilirler.

Homolog duyarsızlaşma durumunda olduğu gibi heterolog duyarsızlaşma durumunda da  $\beta$ -arrestinler, reseptörden G proteinlerini ayırır ve daha fazla bağlanmasını engeller ve internalizasyon ile reseptörün azalmasını artırır.  $\beta$ -arrestinlerin reseptörlere bağlanması adaptör protein 2 ve klatrine olan reseptör afinitesini artırır. Klatrin kaplı veziküller yoluyla reseptörlerin internalizasyonu, uyarılma başladıktan sonra dakikalar içerisinde hızlı bir şekilde gerçekleşir. Internalizasyonu takiben reseptörler endozomlara taşınırlar. Endozomlarda, reseptörler tekrar fonksiyonlarını gerçekleştirmek üzere ayrıldıkları plazma membranına geri gönderilirler. Sürekli reseptör uyarımına cevap olarak internalize olmuş reseptörler lipozomda parçalanırlar. Bu durum, kronik aşırı uyarımı azaltmak için hücredeki toplam reseptör sayısını azaltır. Bu reseptör azalması internalizasyon sonrasındaki saatler ve günler sonrasında başlayabilir (Madamanchi, 2007).

#### **2.4. Kardiyak Hipertrofi**

Kardiyak hipertrofi, genel olarak kalp kütleindeki artış olarak tanımlanır. Doğumdan sonra giderek artan fonksiyonel yükü karşılamak için kalp normalden fazla çalışır. Bu durumda, duvar stresindeki kronik artışı dengelemek için kardiyomiyositlerin kütlelerinde ve boyutunda artış meydana gelir ve böylece kalpte bir büyüme gerçekleşir (Bernardo ve ark., 2010).

Kalp kütleindeki artış büyük ölçüde ventrikül duvarlarının kalınlaşması sonucunda oluşmaktadır. Bu büyüme, mekanik, hemodinamik, hormonal veya patolojik uyarılara yanıt olarak gelişir. Bu uyarılar hipertrofik bir yanıtın başlamasına ve kalp kas kütlelerini arttırarak artan iş yüküne karşı uyum sağlar. Ventrikül duvarlarının kalınlaşması, kardiyomiyositlerin boyutundaki artıştan ve miyosit olmayan hücrelerin çoğalmasından kaynaklanır (Balakumar ve Jagadeesh, 2010). Hücresel düzeyde kardiyak hipertrofi, kalbin fonksiyonunu arttırmak ve ventrikül duvar gerginliğini azaltmak için fetal gen ürünlerinin yeniden ekspresyonundan kaynaklanan protein



sentezinin artması ve böylece miyosit boyutunun artması ile karakterize edilen bir stres yanıt mekanizması olarak tanımlanmaktadır (Selvetella ve Lembo, 2005). Kardiyomiyositlerde fonksiyonel yükteki artışa yanıt olarak gerçekleşen büyüme; sinyal yollarının aktivasyonu, gen ekspresyonundaki değişiklikler, protein sentezi hızındaki artışlar, hücre içi  $Ca^{2+}$  düzenleyicilerindeki ve sarkomerik birimlerin içerisindeki kontraktıl proteinlerin organizasyonundaki değişimler sonucunda meydana gelir (Bernardo ve ark., 2010; Tham ve ark., 2015).

Kalp birçok hücre tipini (kardiyomiyositler, fibroblastlar, endotel hücreler, mast hücreleri, vasküler düz kas hücreleri vb.) içerir. Kardiyomiyositler kalpteki toplam hücre sayısının yaklaşık üçte birini oluşturmalarına rağmen, kalp kütlesinin yaklaşık %70-80'ini oluştururlar (Bernardo ve ark., 2010). Memelilerde doğum sonrasında, kardiyomiyositlerin büyük bir bölümü çoğalma kabiliyetlerini yitirirler. Bu nedenle, kardiyak hücreler hücre bölünmesiyle sayılarını arttıramadıklarından dolayı duvar stresindeki kronik artışı dengelemek ve kalbi sonraki hasarlardan korumak için boyutlarında artış meydana gelir. (Shimizu ve Minamino, 2016). Başlangıçta, hipertrofik kalp artan iş yükünü kompanse edebilir. Ancak, kronik iş yükü devam ettikçe hipertrofi kardiyak talebe uyumsuz hale gelir ve sonuçta dekompanse hipertrofi durumuna, kalp performansının düşmesine ve kalp fonksiyonunda bozulmalara neden olur (Tham ve ark., 2015). Kardiyomiyositlerin büyüklüğündeki hipertrofik artış uyarılara bağlı olarak adaptif ve maladaptif olabilir. Bu duruma bağlı olarak kalp hipertrofisi, fizyolojik ve patolojik kardiyak hipertrofi olmak üzere iki kategoride sınıflandırılır.

## **2.5. Fizyolojik Kardiyak Hipertrofi**

Gelişim sürecinde, egzersiz ve gebeliğe yanıt olarak kalbin büyümesi normal kalp fonksiyonlarının sürdürülmesiyle ilişkilidir ve bu durum fizyolojik hipertrofi olarak adlandırılır. Vücut ağırlığının artması ile kalp ağırlığının artması arasında doğrusal bir ilişki vardır. Gelişim sırasında kalp ağırlığının artması, büyük ölçüde kardiyomiyositlerin genişlemesine bağlanabilir. Doğumdan erişkinliğe kadar geçen süreçte insanlarda kardiyomiyosit çapında yaklaşık üç katlık artış meydana gelir. Fizyolojik hipertrofi, hipertansiyon, kalp kapak hastalığı veya miyokard enfarktüs hastalarında ortaya çıkan patolojik hipertrofidan farklıdır. Fizyolojik hipertrofinin en önemli özelliği ventrikül fonksiyonunun bozulmasından ziyade normal kalması ya da artmasıdır. Örneğin, hamilelerde ve egzersiz yapan kişilerde hem sistolik hem de

diyastolik fonksiyonlar artmakta ya da normal kalmaktadır. Patolojik hipertrofinin aksine fizyolojik hipertrofi geri dönüşümlüdür (Stansfield ve ark., 2014). Fizyolojik hipertrofi, mekanik kuvvetler ve büyüme hormonunun sinyalleriyle gelişir. Fizyolojik bir aralıkta, insülin, insülin benzeri büyüme faktörü 1 ve tiroid hormonu gibi büyüme hormonları ve mekanik kuvvetler PI3K, Akt, AMP ile aktive olan protein kinaz ve mTOR yolları gibi çeşitli sinyallerin aktivasyonu yoluyla fizyolojik kalp hipertrofisi indüklenebilir (Shimizu ve Minamino, 2016). Kardiyak hipertrofinin adaptif olabilmesi için hücre sağ kalım sinyalizasyonu, artan enerji üretimi ve verimliliği, ventriküler duvar büyümesine orantılı anjiyogenez, antioksidan sistemler ve kardiyomiyosit profilasyonu ve rejenerasyonu gibi yanıtların aktivasyonu gereklidir. Bu yollar aktif olarak patolojik tepkileri engeller. Bu nedenle, bu özelliklerin eşlik ettiği ventriküler duvar kalınlaşmasının fizyolojik olduğu düşünülür (Nakamura ve Sadoshima, 2018).

## **2.6. Patolojik Kardiyak Hipertrofi**

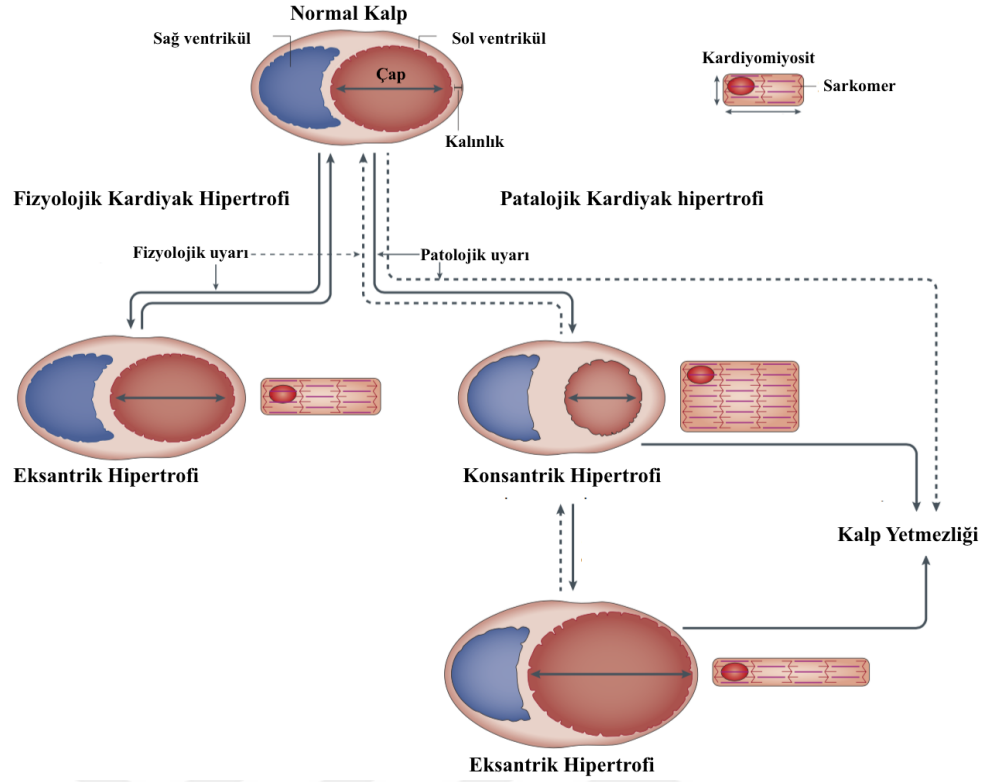
Kalbin hipertansif strese, miyokard yaralanmasına veya aşırı nörohumoral aktivasyona yanıt olarak büyümesi kalpte fonksiyon bozukluğuna neden olur ve bu durum patolojik hipertrofi olarak adlandırılır. Hücre büyümesi ve protein sentezine ek olarak apoptozis, fibrozis,  $Ca^{2+}$  düzenleyici proteinlerinde disregülasyon, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, fetal gen ekspresyonunun aktivasyonu, sarkomer yapısının değişimi ve yetersiz anjiyogenez gibi süreçler gerçekleştiğinde maladaptif dekompanasyon meydana gelir. Bu yanıtları indükleyen sinyal mekanizmaları, maladaptif kardiyak yeniden şekillenmesine (cardiac remodelling), işlev bozukluğuna ve sonunda kalp yetmezliğine neden olur (Nakamura ve Sadoshima, 2018). Başlangıçta aşırı basınç yüklemesiyle indüklenen kardiyak hipertrofiye kardiyak fonksiyon korunur. Bu durum adaptif faz olarak tanımlanır. Kronik olarak devam eden aşırı basınç yükü adaptif fazdan, azalmış ejeksiyon fraksiyonu ve sol ventrikül dilatasyonu ile karakterize edilen, maladaptif faza dönüşür.

Ayrıca, patolojik kardiyak hipertrofi adrenerjik sistemin aşırı aktivasyonu sonucunda da meydana gelmektedir. Dolaşımdaki noradrenalin seviyeleri ve kardiyak yayılımı, kardiyak hipertrofisi olan hipertansif hastalarda, hipertrofisi olmayan ancak benzer kan basıncı seviyelerine sahip kişilerden daha yüksek düzeyde bulunmuştur (Schlaich ve ark., 2003). Ayrıca, gerçekleştirilen prospektif bir çalışmada, 20 yıllık gözlem sonucunda, hipertansif hastalarda sistolik kan basıncı ve beden kitle indeksinden

bağımsız olarak kardiyak hipertrofinin derecesinin tahmin edildiği gösterilmiştir (Osadchii, 2007). Benzer şekilde, köpekler üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada doğal bir  $\beta$ -AR agonisti olan noradrenalinin kronik olarak uygulanması sonucunda sol ventrikül ağırlığında önemli bir artış meydana geldiği gözlemlenmiştir (Stewart ve ark., 1992). Ayrıca, miyosit hacmindeki ve yüzey alanındaki artışlardan kaynaklanan kardiyak büyümenin uyarılması, kardiyomiyositlerin  $\beta$ -AR agonistlerine uzun süre maruz kalmasının ardından gözlenmiştir. Bu durum, miyokard büyümesinin  $\beta$ -AR'lerin uyarılmasından kaynaklanabileceğini göstermektedir (Morisco ve ark., 2001; Tomita ve ark., 2003).

Hem patolojik hipertrofi hem de fizyolojik hipertrofi yapısal değişikliklere bağlı olarak konsantrik ve eksantrik hipertrofi olarak iki gruba ayrılır (Pluim ve ark., 2000). Konsantrik hipertrofide meydana gelen yapısal değişim, orijinal sarkomerlere paralel olarak yeni sarkomerlerin eklenmesiyle ve kardiyomiyositlerin genişliğinin artmasıyla gerçekleşir. Bu durum, aşırı basınç yükünün artmasıyla meydana gelir. Aşırı basınç yükü, sistolik duvar stresinde artışa neden olur. Artan duvar kalınlığı, artmış duvar stresini normalize etmek için ortaya çıkan hipertrofik yanıttır. Konsantrik hipertrofi sonucunda kalp duvarının kalınlaştığı ve odacığının daraldığı görülmektedir. Hipertansiyon ve aort darlığı gibi patolojik uyarılar ve güç antrenmanları gibi fizyolojik uyarılar sonucunda konsantrik hipertrofi gerçekleşmektedir (Hunter ve Chien, 1999; Esposito ve ark., 2002; Nadruz, 2015).

Eksantrik hipertrofi ise artan hacim yükünden kaynaklanır ve orijinal sarkomere seri halde yeni sarkomerler eklenmesiyle kardiyomiyositlerin uzamasına ve kalp odacığının çapının artmasına neden olur. Bu hipertrofik cevap, hacim yükündeki aşırı artış sonucunda kalp odalarının gerilmesiyle artan diyastolik duvar stresini normalize etmek için meydana gelir. Kapak hastalığı gibi patolojik uyarılar ve dayanıklılık antrenmanı gibi fizyolojik uyarılar sonucunda eksantrik hipertrofi gerçekleşmektedir (Hunter ve Chien, 1999; van Berlo ve ark., 2013). Uyarıya bağlı olarak gelişen kardiyak ve hücreSEL yeniden şekillenmesi Şekil 2.4'de özetlenmektedir.



**Şekil 2. 4.** Hemodinamik aşırı yüklenmeye karşı gelişen kardiyak ve hüresel yeniden şekillenme. Şekillenmenin biçimi uyarının doğasına bağlıdır. Aşırı yük, baskın olarak basınçtaki bir artıştan kaynaklandığında, sistolik duvar stresindeki artış, sarkomerlerin paralel olarak eklenmesine ve kardiyak miyositlerin genişlemesine ve konsantrik hipertrofiye neden olur. Aşırı yüke ağırlıklı olarak ventrikül hacmindeki bir artış neden olunca, diyastolik duvar stresindeki artış, sarkomerlerin seri olarak eklenmesine ve kardiyomiyositlerin uzamasına ve eksantrik hipertrofi olarak adlandırılan sol ventrikül dilatasyonuna neden olur (Nakamura ve Sadoshima, 2018).

## 2.7. Kardiyak Hipertrofiye $\beta$ -Adrenerjik Sinyal Yolağının Etkisi

Normal koşullar altında, kalp kütlesi ile kalbe etki eden iş yükü arasında bir denge bulunmaktadır. İş yükü aşırı arttığında bu denge bozulmaya başlar ve kalp bu duruma hipertrofi gelişimi ile karşılık verir. Kardiyak hipertrofi, artan iş yükünün karakteristiğine bağlı olarak birçok farklı sinyal yolağı sonucunda gerçekleşebilir. Bu sinyal yollarından bir tanesi sempatik sinir sisteminden salınan katekolaminler tarafından aktive edilen  $\beta$ -adrenerjik sinyal yolağıdır (Barros Rde ve ark., 1999). Başlangıçta kalp fonksiyonundaki azalmayı telafi etmek için sempatik sinir sistemi aktivitesinde artış meydana gelir. Sempatik sinir sisteminin aktivitesinin artması ile kalp atım hızı ve kardiyak kontraktilite artar ve böylece azalmış kardiyak debiyi ve sistemik kan basıncını kompanse eder. Bununla birlikte kardiyak fonksiyonundaki azalma ilerledikçe kardiyak fonksiyon kaybını telafi etmek için sempatik sinir aktivitesi daha da artar. Ancak, plazmadaki katekolamin seviyesinin artması ile  $\beta$ -AR'lerin sürekli uyarılması patolojik kardiyak hipertrofinin gelişmesine neden olur. Kalbin yüksek katekolamin seviyelerine kronik olarak maruz kalması, sempatik tonun

yükselmesi, kalp fonksiyonunda ve yapısında ilerleyici bozulma gibi patolojik değişikliklere yol açar (Brum ve ark., 2006). Yüksek katekolamin seviyeleri kalpte yapısal olarak miyokard nekrozu ve monosit inflamasyonuna, kolajen birikiminin artmasına ve bunun sonucunda arter duvarında ve miyokarda interstisyel fibrosiz gelişimine neden olur. Katekolamin seviyesinin yükselmesi sonucunda gerçekleşen sol ventrikül değişikliği ve dilate kardiyomiyopati ile birlikte kardiyak oksijen tüketimi ve miyosit apoptozisi artar (de Lucia ve ark., 2014). Başlangıçta yararlı olan sempatik sinir aktivitesi ilerleyen dönemlerde kardiyak fonksiyona zarar vererek kalp yetmezliğinin oluşmasına neden olabilir.

Sempatik sinir sisteminin hiperaktivitesi,  $\beta$ -AR'lerin yoğunluğunun azalmasına ve geriye kalan  $\beta$ -AR'lerin duyarsızlaşmasına neden olur. Böylece  $\beta$ -AR aktivasyonu belirgin biçimde azalmış kardiyak kasılma yanıtı oluşturur. Ayrıca  $\beta$ -AR sinyalindeki değişiklikler G-protein, AC ve GRK2 seviyelerinde de görülmektedir. Fizyolojik koşullarda, toplam kardiyak  $\beta$ -AR'lerin yaklaşık %70-80'nini  $\beta_1$ -AR alt tipi oluşturmaktadır. Patolojik kardiyak hipertrofinin ilerleyen evrelerinde, plazma membranındaki  $\beta_1$ -AR alt tipinin sayısı azalırken,  $\beta_2$ -AR alt tipinin sayısı değişmemektedir (Freedman ve Lefkowitz, 2004). Ayrıca sempatik sinir sisteminin hiperaktivitesi ile GRK2 seviyeleri ve aktivasyonu artar. Artan GRK2 seviyeleri,  $\beta$ -AR internalizasyonunda artış ile birlikte  $\beta$ -AR sinyalinin disfonksiyonuna ve kontraktilite/inotropik yanıtta azalmaya neden olur. Bu değişikliklerden kaynaklanan AR'lerin duyarsızlaşmasından dolayı katekolaminlerin uyarıcı etkilerine azalmış bir yanıt oluşturmaya neden olur (Sato ve ark., 2015). G proteini ve AC ekspresyonu da sürekli  $\beta$ -AR aktivasyonundan etkilenmektedir. Aşırı uyarı altında  $G_i$  ekspresyonu artmakta ve böylece  $G_s/G_i$  oranının azalmasına neden olurken, AC izoformlarının ekspresyon seviyeleri azalmaktadır. Bununla birlikte,  $\beta_1$ -AR'lerin ekspresyonlarının azalması ve duyarsızlaşması,  $G_s/G_i$  oranının azalması ve AC izoformlarının ekspresyonunun azalması cAMP oluşumunu azaltmaktadır (Brum ve ark., 2006).

## **2.8. Patolojik Kardiyak Hipertrofi ve Hücre İçi $Ca^{2+}$ Döngüsündeki Değişiklikler**

Hücre içi  $Ca^{2+}$  regülasyonu; uyarılma-kasılma çiftlenimi, pacemaker aktivitesi ve AV nod iletimi gibi birçok fizyolojik süreci başlatan kalp fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar. Ancak, sempatik sinir sisteminin kronik aktivitesi hücre içi  $Ca^{2+}$  dengesinin bozulmasına neden olur. Uyarılma-kasılma çiftleniminde görev

alan  $Ca^{2+}$  düzenleyici proteinlerin aktivitelerinde ve ekspresyonlarında değişiklikler görülür. Bunun sonucunda, SR  $Ca^{2+}$  yükünde azalma, diyastol sırasında SR'dan  $Ca^{2+}$  sızıntısında artma ve SR'a  $Ca^{2+}$ 'un geri alımında azalma meydana gelir. Bu değişikler dinlenim durumunda sitozolik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun artışına,  $Ca^{2+}$  transient genliğinin azalmasına ve kasılma kuvvetinin zayıflamasına ve relaksasyonun uzamasına ve böylece kasılma fonksiyonunun bozulmasına yol açar (Neef ve Maier, 2013; Villeneuve ve ark., 2014).

## 2.9. L-Tipi $Ca^{2+}$ Kanalındaki Değişiklikler

Kardiyak hücreler, en az iki tip voltajla aktive olan  $Ca^{2+}$  kanalını içermektedir. Bunlardan biri olan L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalları, kardiyomiyositlerin sarkolemmalarında bulunur ve kardiyak AP'nin platosunun ilk kısmındaki yavaş içeri doğru akımın oluşmasından sorumludur. L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalları, -40 mV ile -30 mV arasında aktive olur ve 0 mV ile 10 mV membran potansiyellerinde içeri doğru tepe akımını oluştururlar. Bu kanallar, uzun süre açık kalırlar, büyük bir kondüktansa ve yavaş bir inaktivasyona sahiptirler. L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalları aracılığıyla giren  $Ca^{2+}$  iyonlarının miktarı, SR'dan salınan  $Ca^{2+}$  miktarını etkilemektedir (Mukherjee ve Spinale, 1998). Aktive olan L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalının yoğunluğu ile RyR aracılığıyla SR'dan salınan  $Ca^{2+}$  arasında pozitif bir korelasyon vardır. Aktive olan L-tipi  $Ca^{2+}$  kanal sayısının artması hücre içerisine giren  $Ca^{2+}$  miktarını artırır ve daha fazla sayıda SR üzerinde bulunan RyR kanalının uyarılmasına neden olur. Böylece RyR'den çıkan  $Ca^{2+}$  kıvılcımlarının (spark) yoğunluğu artar.

$Ca^{2+}$  akımının kinetiği ve genliği, iyonik koşullara, membran potansiyeline ve kanalın özelliklerine bağlıdır. Ayrıca akım hem fizyolojik hem de farmakolojik etkilerle modüle edilebilir. Örneğin, fizyolojik koşullar altında, katekolaminler  $\beta$ -AR aracılı AC ve cAMP bağımlı PKA'yı aktive ederek  $Ca^{2+}$  akımının davranışını önemli ölçüde değiştirebilir. Bu durumda, bazal  $Ca^{2+}$  akımında 2 ile 4 katlık artışa neden olur ve aktivasyon ile inaktivasyonun voltaj bağımlılığını daha negatif bir membran potansiyeline kaydırır (Bers ve Perez-Reyes, 1999).

Plazma katekolamin konsantrasyonlarının artışı ile  $\beta$ -AR sinyal yolağının kronik aktivasyonu ve duyarsızlaşması sonucunda, L-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarının bu sinyal yolağına karşı duyarlılığı azalmaktadır. Bu durum,  $\beta$ -AR sayısındaki azalma ile L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalının akım miktarı arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermektedir (Houser ve

ark., 2000; Nass ve ark., 2008). Hipertrofik sürecin ciddiyetine göre L-tipi  $Ca^{2+}$  akımının büyüklüğü farklı şekilde etkilenmiştir. Adaptif hipertrofi durumunda, L-tipi  $Ca^{2+}$  akımının büyüklüğü kontrol değerine göre artmış ya da değişmemiş şekilde iken, kalp yetmezliğine doğru giden kardiyak hipertrofi durumunda ise L-tipi  $Ca^{2+}$  akımının büyüklüğünün kontrole göre azaldığı gözlemlenmiştir (Mukherjee ve ark., 1998; Treinys ve Jurevicius, 2008).

## **2.10. SR $Ca^{2+}$ Regülasyonundaki Değişiklikler**

RyR; fonksiyonunu düzenleyebilen çok sayıda düzenleyici protein içeren büyük bir makromoleküler kompleksin merkezidir. Bu kompleks doğrudan ya da dolaylı olarak RyR'nin sitoplazmik kısmı ile etkileşime giren proteinleri içerir (calstabin2 (FKBP12.6), kalmodulin (CaM), PKA, CaMKII, protein fosfataz-1 (PP1) ve protein fosfataz-2A (PP2A), spinophilin, kalsifestrin ve sorcin). Bu proteinler RyR aktivitesinin belirlenmesinde önemli rol oynarlar (Bers, 2004).

Fizyolojik koşullar altında, sistol sırasında SR üzerinde lokalize olan RyR'ler, L-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarından giren  $Ca^{2+}$  iyonları ile aktive edilirler ve hücre içersine SR'dan  $Ca^{2+}$  salımını tetiklerler. Diyastol sırasında ise SR'dan  $Ca^{2+}$  çıkışının engellenmesi için FKBP12.6'nın RyR'ye bağlanması gerekir. Böylece dinlenim durumunda SR'dan  $Ca^{2+}$  çıkışı engellenmiş olur. Ayrıca FKBP12.6 tek RyR'nin stabilizasyonunu sağlamanın yanı sıra RyR'ler arasındaki kapılamayı da kontrol eder. RyR'ler arasındaki bu bağlantı, kanal gruplarının eş zamanlı olarak açılmasını ve kapanmasını sağlar. RyR'nin aktivasyonu kanal kompleksinden FKBP12.6'nın ayrılması ile birlikte kanalın açılma olasılığını artırır. Bu durum RyR'nin  $Ca^{2+}$  bağımlı aktivasyonunun hassasiyetini arttırır. Aynı zamanda RyR aktivitesi, protein fosfatazlar tarafından da düzenlenmektedir. Hem PP1 hem de PP2A, spinofilin ve PR130 aracılığıyla RyR'ye bağlanır ve RyR aktivitesini azaltır. Bu nedenle, RyR makromoleküler kompleksinde PP1 ve PP2A'nın miktarı RyR'nin aktivitesinin düzenlenmesinde önemlidir (Wehrens ve Marks, 2003; Del Monte ve Hajjar, 2008).

$\beta$ -AR sinyal yolağının kronik uyarımı sonucunda fosfataz miktarındaki azalma, RyR'nin PKA tarafından hiperfosforilasyonuna yol açarak RyR'den FKBP12.6'nın ayrışmasına ve kanal fonksiyonunun bozulmasına neden olur. Çünkü, FKBP12.6'nın ayrılması kanalların kapanmasını değiştirerek RyR'nin açılma olasılığının artmasına neden olduğundan diyastol sırasında SR'dan  $Ca^{2+}$  sızıntısı artar ve böylece SR'da

depolanmış  $Ca^{2+}$  miktarı azalır. Ayrıca RyR kanallarından FKBP12.6'nın ayrılması ve RyR kanallarının fonksiyonel olarak birbirlerinden ayrılması uyarılma-kasılma çiftleniminin kazancında azalmaya katkıda bulunur. RyR'nin düzenlenmesindeki bozulma, kasılmada da bozulmaya neden olur ve kardiyak aritmilerin olasılığını artırır (Marks, 2013).

Hücre içi  $Ca^{2+}$  homeostazisinin diğer bir önemli düzenleyicisi olan CaMKII de PKA ile ortak fonksiyonel hedeflere sahip olduğundan RyR'yi fosforile ederek diyastolik SR  $Ca^{2+}$  sızıntısını aktive edebilmektedir (Ai ve ark., 2005).

SERCA,  $Ca^{2+}$  u enerjiye bağlı bir mekanizma ile  $Ca^{2+}$  gradyanına karşı SR'a taşır ve bir sonraki kasılma için gerekli olan  $Ca^{2+}$  u sağlar. SERCA'nın pompalama aktivitesi PLB tarafından düzenlenir. PLB, 52 aminoasitlik bir peptidten oluşan bir proteindir. PLB fosforile olmadığı durumda  $Ca^{2+}$  ATPaz'ı inhibe ederek SERCA'nın  $Ca^{2+}$  afinitesini azaltır. Ancak PLB'nin fosforilasyonu sonrasında SERCA üzerindeki inhibisyon kalkar ve bunun sonucunda SERCA'nın  $Ca^{2+}$  afinitesi de artar. Ayrıca PLB, cAMP'ye bağımlı PKA ve CaMKII tarafından da fosforile edilir (Nass ve ark., 2008).

Normal şartlarda,  $\beta$ -AR uyarı sırasında cAMP'ye bağlı PKA aktivitesindeki artış, inhibitör-1 (I-1) proteinin fosforilasyonuna neden olur. Aktif hale gelen I-1, PP1 inhibe eder ve böylece PLB üzerindeki inhibisyon etkisi kalkar ve fosforile hale gelebilir. Ancak,  $\beta$ -AR sinyal yolağının kronik uyarımı sonucunda azalmış  $\beta$ -adrenerjik etki I-1'i defosforile eder ve I-1'in defosforilasyonu PP1 aktivitesinin artışına neden olur. PP1 aktivitesinin artışı ise fosforile PLB seviyelerinin azalmasına ve SERCA aktivitesinin azalmasına neden olur. SERCA aktivitesinin azalması sonucunda SR  $Ca^{2+}$  geri alımında bozulma gerçekleşir (Del Monte ve Hajjar, 2008; Lipskaia ve ark., 2010). Ayrıca SR membranında bulunan SERCA miktarının azalması ile SERCA/PLB oranı büyük ölçüde azalır. Bu azalma aktif SERCA miktarının düşmesine neden olur ve bu nedenle kasılma sırasında salınan  $Ca^{2+}$  u SR'a geri alma kapasitesi azalır. Bu sonuç, SERCA aktivitesindeki azalmanın nedenlerinden birinin SERCA ekspresyonundaki azalma olduğunu göstermiştir.

Kardiyak hipertrofi durumunda SERCA aktivitesindeki azalma ya ekspresyonun azalmasından ya da PLB'nin fosforilasyon seviyelerindeki azalmadan kaynaklanır. SERCA aktivitesindeki azalma, SR'a alınan  $Ca^{2+}$  miktarında azalmaya, diyastolik



$Ca^{2+}$  miktarında artışa, SR  $Ca^{2+}$  depolarının azalmasına,  $Ca^{2+}$  transienlerinin uzamasına ve SR  $Ca^{2+}$  salımında azalmaya yol açmaktadır. Bu durum nihayetinde kasılma kuvvetinin azalmasına, gevşemenin bozulmasına ve kuvvet-frekans ilişkisinde değişime yol açar (Fragoso ve Zarain-Herzberg, 2014).

### **2.11. Kalpte Reaktif Oksijen Türleri (ROT) ve Sinyal Yolakları**

Redoks reaksiyonlar, elektronların bir maddeden diğerine aktarılması olarak tanımlanır ve bu türden reaksiyonlar normal hücre metabolizmasının önemli bir parçasıdır. Aerobik organizmalarda, metabolik reaksiyonlar sırasında sürekli olarak serbest radikaller açığa çıkar. Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran reaktif, kararsız atom veya moleküllerdir. Bu atom veya moleküller radikal olmayanlarla reaksiyona girerek yeni radikaller oluşturabilir. Biyolojik sistem için vazgeçilmez bir unsur olan oksijenin, dış yörüngesinde iki eşleşmemiş elektrona sahip olması oksijeni radikal oluşumuna duyarlı hale getirir. Moleküler oksijenin indirgenmesi sonucunda oluşan serbest radikallere ROT denir. ROT'lar hücresel solunumun ve metabolizmanın bir yan ürünü olarak veya redoks sinyallenmesine katılan enzimler tarafından üretilirler. Başlıca ROT'lar; süperoksit anyonu, peroksil, lipid peroksil, hidroksil radikali ve alkoksil radikalidir. ROT'lar endojen ve eksojen kaynaklar aracılığıyla meydana gelmektedir. Kalpteki ana endojen ROT kaynakları arasında mitokondriyel solunum zinciri enzimleri, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazlar, lipoksijenazlar, miyeloperoksidazlar, bağlanmamış nitrik oksid (NO) sentazları, ksatin oksidazlar ve monoamin oksidazlar yer almaktadır.

Kardiyovasküler sistemdeki başlıca ROT kaynaklarından biri olan NADPH oksidaz enzim ailesinin her bir üyesi Nox adı verilen bir katalitik ünite içerir. Nox'lar p-22phox olarak adlandırılan düşük moleküler ağırlıklı alt birim ile heterodimer bir yapı oluşturur. Bu heterodimerik yapı, NADPH'dan moleküler  $O_2$ 'ye elektron transfer ederek süperoksit oluşumuna neden olur. Bugüne kadar NADPH oksidazların temelini oluşturan yedi Nox izoformu tanımlanmıştır ve her biri ayrı gen tarafından kodlanmaktadır. Bu izoformlar; kardiyomiyosit, fibroblastlar, vasküler düz kas hücreleri dahil olmak üzere kalp içindeki spesifik hücre tiplerinde bulunur. Nox2 ve Nox4 kardiyomiyositlerde baskın olarak eksprese olan izoformlardır. Nox2 ve Nox4 enzimleri farklı lokasyonlarda bulunurlar. Kardiyomiyositlerde Nox2 genel olarak sarkolemma ve t-tübülünde yer alırken, Nox4 mitokondrinin, endoplazmik

retikulumun ve çekirdeğin zarlarında lokalize olmaktadır (Perjés ve ark., 2012). Nox2, spesifik agonistler tarafından hücre uyarılmasından sonra aktive edilir. Aktivasyonu için hücre içinde bulunan düzenleyici alt birimlerden p-47phox, p-67phox, p-40phox ve Rac1'in bir araya gelmesi gerekir. Ancak Nox4 yapısal olarak aktiftir ve düzenleyici alt birimlerine ihtiyaç duymaz. Nox4'ün düzenlenmesi temel olarak ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerle gerçekleşir. Bununla birlikte süperoksit üreten Nox2'nin tersine, Nox4 ağırlıklı olarak hidrojen peroksit üretir (Sirker ve ark., 2011). Genellikle Nox'lar G protein bağlı reseptör aracılı sinyal yolları ile aktive olmaktadır. Nox'lar tarafından oluşturulan ROT birçok sinyal yolağını ve redoksa duyarlı proteinleri modüle eder (Nabeebaccus ve ark., 2011). Nox'ların aktivitesi, sol ventriküler hipertrofi ve kalp yetmezliği ile ilişkili olan uyarılarla önemli ölçüde artmaktadır. Bu nedenle kalp yetmezliğine sahip olan hastalarda Nox'ların alt birimlerinin ekspresyonlarında ve aktivitelerinde artış meydana gelir (Murdoch ve ark., 2006).

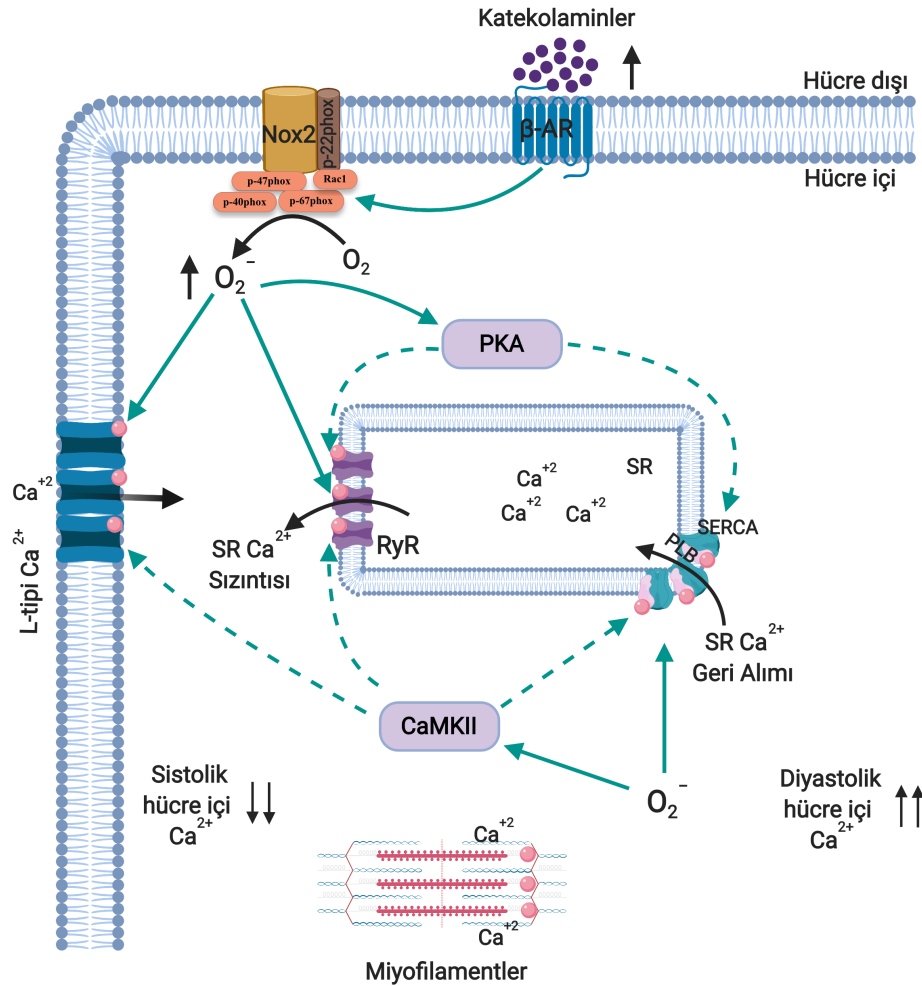
Kalp, organlar arasında en yüksek oksijen tüketimine sahip organ olmasından dolayı redoks sinyali kalp patolojisinde önemli role sahiptir. Bu nedenle hem sistemik hem de kalp yetmezliği olan hastaların miyokardında ROT üretiminin aşırı arttığı ve bunun sonucunda oksidatif stresin olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca oksidatif stres kardiyomiyositlerde hipertrofi, fibroz, apoptoz ve kardiyak yeniden şekillenmesi süreçlerine katkıda bulunmaktadır (Kohler ve ark., 2014). Kalp fonksiyonunun gerçekleşmesinde başat role sahip olan uyarılma-kasılma çiftlenimi aşırı ROT artışından önemli oranda etkilenmektedir (Santos ve ark., 2016). ROT'lar uyarılma-kasılma çiftleniminde yer alan birçok düzenleyici proteinin ve sinyal yollarının aktivitesini değiştirir. Bununla birlikte ROT'lar miyosit büyümesine neden olan sinyal yollarını da aktive etmektedir. ROT'lar iyon kanalları ve taşıyıcı proteinleri üzerinde direkt etkiye sahip olmalarının yanı sıra, protein kinaz aktivitesini de redoks modifikasyonu yoluyla dolaylı olarak etkilemektedir (Hasenfuss ve Mann, 2015). Endojen kaynaklar tarafından üretilen ROT'lar bu proteinlerdeki sistein rezidülerinin sülfhidril gruplarını oksitleyerek disülfid bağlarının oluşmasına yol açmaktadır. Bununla birlikte proteinlerin metiyonin rezidülerini de oksitlemektedir. Böylece ROT'lar proteinlerin yapısını etkileyerek fonksiyonlarının değişmesine neden olur (Eager ve Dulhunty, 1998; Kassmann ve ark., 2008). Böylece oksidatif stres uyarılma-kasılma çiftleniminde yer alan birçok proteinin ekspresyonunu ve aktivitesini değiştirerek

kasılma fonksiyon bozukluğunun, aritmilerin ve muhtemel kalp yetmezliğinin gelişimine katkıda bulunur (Hafstad ve ark., 2013).

$Ca^{2+}$  düzenleyici proteinler arasında yer alan L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalının gözeneğini oluşturan  $\alpha_{1C}$  alt birimi 10'dan fazla sistein rezidüsü içermektedir. Bu nedenle gözeneği oluşturan birim redoks modifikasyonuna duyarlıdır (Wagner ve ark., 2013). Bu durumun etkisiyle ROT'lar kardiyomiyositlerde  $Ca^{2+}$  akımını azaltır (Gill ve ark., 1995; Lacampagne ve ark., 1995; Fearon ve ark., 1999). Ancak yapılan başka bir çalışmada ise ROT'ların  $Ca^{2+}$  akımını arttırdığı gözlemlenmiştir (Song ve ark., 2010). Bir diğer düzenleyici protein olan RyR'nin fonksiyonu da redoks regülasyonundan etkilenmektedir. Bir RyR monomerinde yaklaşık 21 tanesi serbest olan, 89 adet sistein rezidüsü bulunmaktadır. Bu nedenle oksidatif modifikasyona maruz kalmaktadır. RyR sistein rezidülerinin oksidasyonu sonrasında RyR'nin açılma olasılığının artması sonucunda SR'ın  $Ca^{2+}$  kaybına neden olduğu ve bu durumun özellikle diyastol sırasında ortaya çıktığı gösterilmiştir (Xu ve ark., 1998; Terentyev ve ark., 2008). RyR'nin ROT kaynaklı aktivasyonu, ROT konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine de bağlıdır. RyR'nin ROT'lara uzun süre ve aşırı konsantrasyonlarına maruz kalmasından sonra geri dönüşü olmayan biçimde inaktive olmaktadır (Yan ve ark., 2008). SERCA ve düzenleyici proteini olan PLB de, redoks modifikasyonu için substrattır (Wagner ve ark., 2013). SERCA, 25 sistein rezidüsü içermektedir. Bu nedenle oksitleyici ajanların veya oksijen radikal üretici sistemlerin SERCA fonksiyonunu azalttığı gösterilmiştir (Xu ve ark., 1997).

$Ca^{2+}$  düzenleyici proteinlerin aktivitesinde rol oynayan serin/treonin kinazlar da redoks modifikasyonuna maruz kalmaktadır. Uyarılma-kasılma çiftleniminde etkili olan PKA'nın sistein rezidülerinin oksidasyonu sonrasında alt birimler arasında disülfid bağların oluşumuna neden olurlar. Bir diğer etkili olan kinaz ise CaMKII'dir. Düzenleyici bölgesindeki metiyonin rezidüleri (Met-281/282) oksidasyona uğrayabilir ve Ca/CaM'ın uzaklaşsa dahi CaMKII aktivitesinin korunmasına neden olabilir. Hem PKA hem de CaMKII oksidasyonu kontraktıl disfonksiyona ve aritmilere katkıda bulunmaktadır (Kohler ve ark., 2014; Sag ve ark., 2014). Oksidasyon sonrasında aktive olan PKA ve CaMKII sırasıyla L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalının  $\alpha_{1C}$  ve  $\beta_{2A}$  alt birimlerindeki ilgili alanları fosforile ederek  $Ca^{2+}$  akımında artışa neden olurlar. Sonuç olarak ROT'lar serin/treonin kinazlar yoluyla  $Ca^{2+}$  akımında artışa ve doğrudan sistein

oksidasyonu yoluyla  $Ca^{2+}$  akımında azalmaya neden olabilir (Yang ve ark., 2005; Abiria ve Colbran, 2010). Ayrıca PKA veya CaMKII'nin oksidasyonu sonrasında RyR'yi fosforile ederler. Bu durum RyR aktivasyonu ile diyastolik SR  $Ca^{2+}$  sızıntısını artırır. Sonuç olarak ROT'ların hem kinazlar yoluyla hem de kanala direkt oksidasyonu diyastolik  $Ca^{2+}$  sızıntısını artırır ve SR  $Ca^{2+}$  içeriğinin azalmasına neden olabilir (Burgoyne ve ark., 2012). Aynı zamanda oksidasyon sırasında aktive olan PKA ve CaMKII, PLB fosforilasyonuna neden olarak SERCA fonksiyonunu artırır. Sonuç olarak ROT'ların direkt oksidasyonu sonrasında SERCA aktivitesi azalırken, kinazlar aracılığıyla gerçekleşen oksidasyonda SERCA aktivitesi artmaktadır (Şekil 2.5) (Kohler ve ark., 2014).



**Şekil 2. 5.** ROT'ların uyarılma-kasılma üzerindeki etkisi. ROT'lar iyon kanalları ve taşıyıcı proteinleri üzerinde direkt etkiye sahip olmalarının yanı sıra, protein kinaz aktivitesini de redoks modifikasyonu yoluyla dolaylı olarak etkilemektedir. Uyarılma-kasılma çiftlenimindeki bozulma diyastolik  $Ca^{2+}$  artışına ve sistolik  $Ca^{2+}$  azalmasıyla sonuçlanabilir. Kesintisiz yeşil çizgiler aktivasyonu gösterir; kesikli çizgiler protein kinazlar üzerinden dolaylı etkileri göstermektedir.

## 2.12. Antioksidan Savunma Sistem

Antioksidan savunma mekanizması hücrelerde oluşan serbest radikallerin ve reaktiflerin uzaklaşmasını sağlayarak birikmesini önler. Hücreyi serbest radikallerden temizleyen ve böylece hücre hasarını engelleyen maddelere antioksidan denir. Fizyolojik şartlar altında serbest radikallerin oluşumu ile, oluşan bu serbest radikallerin antioksidanlar tarafından uzaklaştırılması denge halindedir. Ancak, bazı durumlarda serbest radikal üretimi organizmanın antioksidan savunma mekanizmasının üstesinden gelebilecek seviyeyi aştığından dolayı, fizyolojik durumdaki antioksidan-oksidan dengesi oksidanlar lehine kaymaktadır (Ighodaro ve Akinloye, 2018). Nihayetinde ROT üretiminin aşırı artışı hücre yapısında ve fonksiyonunda, proteinlerde, lipidlerde, karbonhidratlarda ve DNA'larda temel biyomoleküllerin oksidasyonunu tetikleyerek birçok hastalık durumuna yol açan hücresel bir oksidatif ortam yaratır. Bu yüzden serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki etkileşim hastalıklardan korunmada çok önemlidir. Serbest radikallere maruz kalmanın azaltılması ve antioksidan bakımından zengin gıdaların veya antioksidan takviyelerin alınması vücudun serbest radikallerle ilgili sağlık sorunları riskini azaltır (Lobo ve ark., 2010; Mathew ve ark., 2011).

Antioksidanlar endojen veya diyetin bir parçası olarak eksojen olarak elde edilir. Endojen antioksidanlar, hücresel fonksiyonun korunmasında önemli bir rol oynar. Ancak aşırı ROT üretimini destekleyen koşullar altında endojen antioksidanlar yeterli olmayabilir ve optimal hücresel fonksiyonları sürdürmek için eksojen antioksidanlar gerekebilir (El-Bahr, 2013). Antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan olarak sınıflandırılır. Süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz, katalaz, Glutasyon S-transferaz'lar enzim olan antioksidanlardır. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise glutasyon, melatonin, ürik asit, seruloplazmin, transferrin ve diğer bileşiklerdir. Eksojen kaynaklı enzimatik olmayan antioksidanlar ise vitamin E,  $\beta$ -karoten, askorbik asit ve polifenollerdir (Valko ve ark., 2007; Dontha, 2016).

Canlı sistemindeki antioksidan savunma sistemini oluşturan antioksidan moleküller serbest radikallere farklı düzeylerde etki ederler. Bu etkiler radikal önleyici, radikal temizleyici ve radikallerin neden olduğu hasar onarımıdır. Serbest radikal önleyici antioksidanlar serbest radikal haline gelme potansiyeli olan molekülü veya başka radikallerin üretimini indüklemeye kabiliyetine sahip serbest radikalleri nötralize ederler. Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon peroksidaz gibi antioksidanlar

radikal önleyici etki gösterir. Bu antioksidanlar süperoksit radikalini, hidrojen peroksite ve hidroperoksit olan zararsız moleküllere ayrıştırır. Ayrıca, demir ve bakırı ayıran ve dolayısıyla serbest radikal oluşumunu önleyen transferrin ve seruloplazmin gibi metal iyon bağlayıcılar da bu etkiye sahiptir. Radikal temizleyici antioksidanlar, serbest radikallere elektron vererek nötralize ederler. Bu süreçte serbest radikal kendileri olurlar. Bu oluşan yeni radikaller kolayca nötralize edilir ve bu gruptaki diğer antioksidanlar tarafından tamamen zararsız hale getirilir. Vitamin E, askorbik asit, polifenoller, ürik asit ve glutatyon bu etkiye sahip olanlardır. Hasar onarımı yapan antioksidanlar ise serbest radikallerin biyomoleküllere verdikleri hasarı giderirler ve hasarlı hücre membranını yeniden yapılandırır. Hasarlı DNA, protein ve lipidlerin onarımını sağlayan bir grup enzimlerdir. Bu enzimler zarar görmüş proteinleri, DNA ve lipidleri tanırlar, yıkarlar ve uzaklaştırırlar. Yaygın örnekleri arasında polimerazlar, glikosilazlar, nükleazlar, proteinazlar, proteazlar ve peptidazlardır (Lobo ve ark., 2010; Ighodaro ve Akinloye, 2018).

### **2.13. Ellagik Asidin Antioksidan Özellikleri**

Ellagik asit (EA) bitkilerden elde edilen ve birçok gıdada doğal olarak bulunan fenolik bir asittir. EA ya serbest formda ya da ellagitanninlerin bir parçası olarak bulunur. Ellagitanninler, glukoz merkezlerine bağlanan heksahidroksidifenoil ve gallik asidin polimerlerinden oluşur. Fizyolojik koşullar altında ellagitanninlerin hidrolizi sonucunda EA elde edilir. EA daha sonra farklı ürolitinler üretmek için bağırsak mikrobiyotası tarafından kademeli olarak metabolize edilir (Landete, 2011). Böylelikle ellagitanninler, EA ve ürolitinler gibi birçok metabolitini serbest bırakmak için metabolize edilir. EA, kimyasal adı 2,3,7,8-tetrahidroksi-kromeno (5,4,3-cde)-kromen-5,10-dion olan bir antioksidandır (Roche ve ark., 2017). Yapısal olarak lipofilik bölgeyi temsil eden dört hidroksil grubu ile hidrojen bağı oluşturan ve elektron alıcıları olarak görev yapan hidrofilik domaini temsil eden iki lakton grubundan oluşur. İki den fazla hidroksil grubunun varlığı bu fenolik bileşiğin polifenolik olarak sınıflandırmasına neden olur. EA'nın yapısının iki çift hidroksil gruba sahip olması güçlü antioksidan potansiyelinin ana nedenidir (Zeb, 2018). Yapılan bir çalışmada bu iki hidroksil grubunun EA'nın antikanserojen aktivitesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Barch ve ark., 1996). Hidroksil, NO, nitrit, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) gibi farklı serbest radikallerle EA'nın reaksiyon durumunda, bu radikallerin etkisi ve konsantrasyonu önemli ölçüde azalmıştır

(Priyadarsini ve ark., 2002).

EA birçok besinin içinde bulunan doğal bir antioksidandır. İçeriğinde EA barındıran besinler arasında ahududu, kızılıçık, yaban mersini, böğürtlen, çilek, nar, karadut, fındık, ceviz ve badem yer almaktadır (Rios ve ark., 2018). EA'nın, süperoksit ve hidrojen peroksit radikallerine karşı koruyucu bir etkisi mevcuttur. EA'nın antiproliferatif ve antioksidan özelliklerinden dolayı tüketiminin potansiyel yararları üzerinden birçok bilimsel araştırma yürütülmüştür. Polifenollerin antioksidan kapasiteleri nedeniyle bazı kanser türlerini, diyabeti, kardiyovasküler hastalıkları ve inflamasyonu önlemedeki veya tedavisindeki rollerinin güçlü bir şekilde desteklenmesi konusunda araştırmalar ortaya çıkmıştır (Scalbert ve ark., 2005).

EA'nın antikanser etkisi hücre döngüsünü inhibe ve apoptozisi indüklemeye kabiliyeti ile deri, kolon ve meme kanseri dahil olmak üzere birçok kanser hücre hattında incelenmiştir. Sıçanlara 24 hafta boyunca EA içeren diyet verilmesinin ardından EA uygulanan grupta tümör hacminin %75 ve tümör çokluğunun %44 azaldığı gözlenmiştir. Böylece meyvelerden elde edilen EA'nın meme tümör oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (Aiyer ve ark., 2008). Antikansorejen etkisi üzerine yapılan bir diğer çalışmada obeziteye bağlı kolon kanserinde EA'nın terapötik etkisi araştırıldığında, leptin bakımından zenginleştirilmiş mikroortamda EA'nın hücre çoğalmalarını, aktive edilmiş kaspaz 8'i ve hücre döngüsünü inhibe ettiği gösterilmiştir (Yousef ve ark., 2016). Böylece EA ve benzeri fenollerin çeşitli kanser türleri üzerinde büyük bir etkisi olduğu gösterilmiştir.

Kardiyovasküler hastalıklarda da EA'nın aktivitesini aydınlatmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Stres modeli ile ilgili yapılan bir çalışmada  $CaCl_2$  ile indüklenen aritmiler sonucunda oluşan stres üzerine EA'nın etkisi araştırıldığında, EA alan grupta erken atım, fibrilasyon ve ventriküler taşikardinin görülme oranını azalttığı ve böylece EA'nın kalpte koruyucu bir fonksiyona sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Dianat ve ark., 2015). Yapılan bir çalışmada EA'nın arsenik trioksit kaynaklı kardiyotoksisiteye karşı koruyup korumadığı değerlendirildiğinde EA'nın, arsenik trioksit kaynaklı glutatyon peroksidaz aktivitesindeki ve malondialdehit konsantrasyonundaki artışı ve ayrıca QT uzamasını ve kardiyak doku hasarlarını azalttığı gözlenmiştir. Böylece EA'nın arsenik trioksit toksisitesine karşı kardiyoprotektif etkilerinin olduğu ve bu koruyucu etkilerinin, EA'nın antioksidan

özellikleri aracılığıyla gerçekleştiği ileri sürülmektedir (Hemmati ve ark., 2018). N $\omega$ -Nitro-l-arginin metil ester hidroklorür (L-NAME) tarafından indüklenen oksidatif stres ve hipertansiyon üzerine EA'nın etkisi araştırıldığında L-NAME uygulamasının ardından artan sistolik kan basıncı ve kalp atış hızı artışının EA uygulamasıyla normal seviyelere geri döndüğü ve EA uygulanan hipertansif sıçanlarda, süperoksit üretiminin artışından sorumlu olan NADPH oksidazın alt birimi p-47phox ekspresyonunun azaldığı ve böylece NO biyoyararlanımını geri kazandırması sonucunda hipertansiyonu azalttığı tespit edilmiştir (Berkban ve ark., 2015). İSO ile indüklenen deneysel miyokardiyal enfarktüs modelinde EA uygulamasının patolojik aritmi, ventriküler hipertrofi ve lipid peroksidasyonunda azalmaya neden olduğu bulunmuştur (Kannan ve Quine, 2013). Benzer bir çalışmada serum demir, serum ürik asit ve kan glukoz seviyelerinde önemli bir artış ve plazma demir bağlama kapasitesi, serum total proteini, albümin/globülin oranı ve kalp glikojen seviyelerinde anlamlı bir düşüş gösterilmiştir. Bununla birlikte EA uygulamasıyla serum demiri, plazma demir bağlama kapasitesi, ürik asit, glikoprotein ve elektrolitler dahil olmak üzere birçok hematolojik ve biyokimyasal parametrelerin normal seviyelere geri döndüğü görülmüştür (Kannan ve ark., 2012). Metabolik sendromun sonucunda ventriküler fonksiyonlarda meydana gelen değişikliğe karşı EA'nın koruyucu etkisi incelendiğinde yüksek yağ ile beslenen tavşanlarda artan oksidatif stres ve aterosklerotik lezyon düzeylerinin EA uygulamasından sonra azaldığı gözlenmiştir (Yu ve ark., 2005).

Namekata ve ark. (2013) tarafından gerçekleştirilen çalışmada EA'nın diyabet sonucunda kardiyomiyositlerde değişen Ca<sup>2+</sup> regülasyonu üzerindeki etkileri araştırılmış ve EA uygulaması sonucunda diyabet nedeniyle yavaşlayan gevşemenin ve Ca<sup>2+</sup> transient inişinin düzeldiği ve yine artmış olan diyastolik Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, diyastol sırasında sitozolik Ca<sup>2+</sup>'un uzaklaştırılması sürecindeki yavaşlamanın ana sebebinin SERCA aktivitesindeki yavaşlamadan kaynaklanabileceği öngörülmüştür. Bu durumu değerlendirmek için bir SERCA inhibitörü olan siklopiazonik asit akut olarak uygulanmış ve EA'nın düzelttiği gevşeme hızını inhibe ettiği görülmüştür. Bu sonuçlar, diyabet kaynaklı miyokardiyal diyastolik disfonksiyonun SERCA aktivitesinin azalmasından kaynaklanabileceğini ve bu anormalliklerin EA ve benzeri SERCA aktivatörleri tarafından iyileştirilebileceğini düşündürmektedir. Bu



çalışmada, EA'nın bir SERCA aktivatörü olarak diyabet kaynaklı miyokardiyal diyastolik disfonksiyonu etkili bir şekilde düzeltebileceği sonucuna varılmıştır (Namekata ve ark., 2013). Ayrıca, Olgar ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, izole edilen kalp hücreleri üzerine akut olarak uygulanan EA'nın  $Ca^{2+}$  akımlarını NO-GC-cGMP yolağını aktive ederek baskıladığı gösterilmiş ve kronik uygulamasının hipertansiyon ve iskemik kalp hastalıkları gibi patofizyolojik durumlarda faydalı olabileceği ileri sürülmüştür. Sonuç olarak, yapılan birçok çalışmada EA'nın kalp üzerinde koruyucu veya tedavi edici etkileri olduğu gösterilmiş olduğundan, EA içeren diyetlerin kullanımının kardiyovasküler hastalıkların oluşmasının önlenmesinde ve/veya tedavisinde önemli yararları olabileceği düşünülmektedir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Deney Gruplarının ve Sürecinin Oluşturulması

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı bünyesindeki laboratuvarlarda gerçekleştirildi. Çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'unun onayı ve gözetimi kapsamında 12 haftalık 113 adet Wistar türü erkek sıçan kullanıldı. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesinden tedarik edilen sıçanlar her kafeste en fazla 4 hayvan bulunacak şekilde yem ve su kısıtlaması olmaksızın tutuldu.

Gruplandırma; Kontrol grubu, İSO uygulanan grup (İSO), İSO ve EA uygulanan grup (İSO+EA), EA uygulanan kontrol grubu (K+EA) olarak yapıldı. Kontrol grubunda 18, K+EA grubunda 18, İSO grubunda 48 ve İSO+EA grubunda 29 sıçan çalışmaya dahil edildi. 4 haftalık deney süresi boyunca İSO ve İSO+EA grubundaki sıçanlara İSO subkütan olarak enjekte edildi. İSO grubuna gavaj yoluyla salin verilirken, İSO+EA grubundakilere ise EA verildi. Kontrol ve K+EA grubunda yer alan sıçanlara ağırlıklarına uygun olarak salin solüsyonu subkütan olarak enjekte edildi. Kontrol grubunda yer alan sıçanlara gavaj yoluyla salin verilirken, K+EA grubunda bulunan sıçanlara EA verildi. İSO (5 mg/kg/gün) ve EA (20 mg/kg/gün) izotonik salin içerisinde çözüldü ve 4 haftalık deney süresi boyunca her gün taze olarak hazırlandı.

#### 3.2. Hücre İzolasyonunun Gerçekleştirilmesi

Deney gruplarında yer alan sıçanların kardiyak miyositlerinin elde edilmesi için hafif anestezi (50 mg/kg sodyum pento barbital) altında kalpleri çıkarıldı. Hızlı bir şekilde çıkarılan kalpler aorta geçirilen bir kanül yardımıyla Langendorff sistemine bağlandı. Perfüzyon sistemine asılan kalplerden ilk olarak içeriği (mM): 137 NaCl; 5,4 KCl; 11,8 HEPES; 0,5 MgCl<sub>2</sub>; 1,5 CaCl<sub>2</sub>; 10 Glikoz ve pH: 7,35 olan Tyrode solüsyonu geçirilerek kalbin içerisindeki kan boşaltıldı. Daha sonra kalpler içeriği (mM): 117 NaCl; 5,7 KCl; 4,4 NaHCO<sub>3</sub>; 1,5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 3,6 MgCl<sub>2</sub>; 20 HEPES; 11,7 Glikoz; 20 taurine olan ve pH 7,20 koruması için %95 O<sub>2</sub>-%5 CO<sub>2</sub> gazlanan solüsyon ile 5 dakika boyunca yıkandı. Bu sürecin sonunda kalplerden 20-25 dakika boyunca aynı solüsyon içeriğiyle hazırlanmış olan kollajenaz A (0,7-1,2 mg/ml) enzimi geçirildi. Enzim yardımıyla hücreler ayrıştırıldıktan sonra kalpler perfüzyon sisteminden bir kaba alınarak makasla ince bir şekilde dilimlenerek parçalandı. Daha sonra parçalanmış doku 100 µm'lik ince bir filtreden geçirildi ve hücreler bir kabın içerisine alındı. Ortamdaki hücrelerin Ca<sup>2+</sup> adaptasyonu kademeli olarak gerçekleştirildi

ve yaklaşık 1 saat sonra elektrofizyolojik deneylere başlandı. Tüm kayıtlar  $36\pm 1$  °C sıcaklığa ayarlanmış ve sürekli perfüze edilen hücre banyosu içerisinde gerçekleştirildi.

### **3.3. Kasılma Parametrelerinin Ölçümü**

İzole edilen kalp hücrelerinden kasılma yanıtları alabilmek için Tyrode solüsyonu bulunan banyo içerisine elektriksel alan uyarısı oluşmasını sağlayan iki elektrot yerleştirildi. Banyo içerisindeki hücreler 0,5 Hz frekansa ve 5-7 V genliğe sahip uyarı ile uyarılarak sarkomer kısalma traseleri kaydedildi (IonOptix LLC, Milton USA). Hücrelerden alınan kasılma yanıtları Ionwizard (IonOptix, USA) programı ile analiz edildi. Analiz sonucunda gruplar arasındaki % fraksiyonel kısalma oranı, gerimin tepeye çıkış süresi (TP), relaksasyonun %50, 75 ve 90'nına iniş sürelerinin ( $RT_{50}$ ,  $RT_{75}$ ,  $RT_{90}$ ) değişimleri hesaplandı.

### **3.4. Hücre İçi Serbest $Ca^{2+}$ Derişimi Ölçümü**

Gruplar arasında hücre içi ortamdaki serbest  $Ca^{+2}$  değişiminin ölçümü için ilk olarak izole edilen kardiyomiyositler fura-2AM (4  $\mu$ M) ile oda sıcaklığında 15-20 dakika inkübe edildikten sonra, iki defa yıkanarak ortamdaki fazla boya temizlendi. Daha sonra fura-2AM ile yüklenmiş olan kardiyomiyositler Tyrode solüsyonu bulunan ve elektriksel alan uyarısı oluşturmak için elektrot yerleştirilmiş banyo içerisine alındı. Kayıt sırasına geçerken uyarılabilen bir hücre seçildi ve hücre boyutunda pencere ayarlandı. Ardından aynı pencere boyutunda hücre bulunmayan alandan yaklaşık 80 s boyunca ortamdaki floresans sinyali kaydedildi ve daha sonra seçilen hücre pencereye getirilerek ortamın sinyali hücre içi bazal  $Ca^{2+}$  sinyalinden çıkartıldı. Böylelikle ortamdaki floresanstan kaynaklanan gürültü ortadan kaldırıldı. Arkasından yaklaşık 80 s bazal  $Ca^{2+}$  sinyali kaydedildikten sonra, 5-7 V genliğindeki 0,5 Hz frekanslı elektriksel alanın oluşturduğu  $Ca^{+2}$  transientleri kaydedildi (IonOptix LLC, Milton USA). Hücrelerden alınan  $Ca^{2+}$  transient yanıtları Ionwizard (IonOptix, USA) programı ile analiz edildi. Analiz sonucunda gruplar arasında hücre içi bazal  $Ca^{2+}$  seviyeleri,  $Ca^{2+}$  transienti genlikleri,  $Ca^{2+}$  transientlerinin tepeye çıkış süreleri,  $Ca^{2+}$  transientleri için relaksasyonun %50, 75 ve 90'ına ulaşma süreleri karşılaştırıldı.

### 3.5. SR Ca<sup>2+</sup> İçeriğinin Ölçülmesi

SR Ca<sup>2+</sup> içeriğinin gruplar arasındaki değişimini ölçmek için kardiyomiyositler fura-2 AM (4 µM) ile oda sıcaklığında 15-20 dakika inkübe edildi. Daha sonra fura-2AM ile yüklenen hücreler Tyrode solüsyonlu banyoya alındı. Kayıt sırasında seçilen hücre boyutunda pencere ayarlandı. Daha sonra ayarlanan pencere boyutu değiştirilmeden hücre bulunmayan bir alana getirildi ve kayıt alındı. Ortamdaki gürültüyü ortadan kaldırmak için hücre bulunmayan ortamdan alınan kayıt hücre içi sinyalden çıkarıldı. Seçilen hücre ekrana getirilerek 2-2,5 MΩ'luk elektrotlar yardımıyla hücreye sıkı bir şekilde yapışıldı ve 1 Hz frekansa sahip AP protokolü çalıştırıldı. Ca<sup>2+</sup> transientlerinin görülmesinin ardından protokol kapatıldı ve 10 mM kafein kapiller borular aracılığıyla hücre üzerine 10 s boyunca perfüze edilerek hücre içi Ca<sup>2+</sup> miktarındaki değişim kaydedildi. Hücrelerden alınan yanıtlar Ionwizard (IonOptix, USA) programı ile analiz edildi.

### 3.6. L-tipi Ca<sup>2+</sup> Akımlarının Kaydedilmesi

Gruplar arasında L-tipi Ca<sup>2+</sup> akımlarındaki değişimi değerlendirmek için voltaj kenetleme tekniği kullanıldı. L-tipi Ca<sup>2+</sup> akımının ölçümü tüm-hücre konfigürasyonunda gerçekleştirildi. Bunun için hücre membranına 2-2,5 MΩ'luk pipetin yapışması sağlandı ve pipet direnci GΩ seviyesine ulaştığında elektrik pulsu yardımıyla hücre membranı kırıldı. Daha sonra -70 mV düzeyinde kenetlenmiş olan hücrenin Na<sup>+</sup> akımını etkisiz hale getirmek için belirli bir süre -45 mV'luk ön puls uygulandı. Ardından -50 mV'tan 10 mV'luk artışlarla +60 mV'a 300 ms'lik depolarize edici pulslar uygulanarak 12 farklı voltaj seviyesinde Ca<sup>2+</sup> akımları kaydedildi. Kayıt sırasında içeriği (mM): 120 Cs-aspartat; 20 CsCl; 5 MgATP; 10 NaCl; 10 HEPES ve pH= 7,2 olan pipet solüsyonu ve K<sup>+</sup> akımlarını bloke etmek için kapiller borular aracılığıyla hücre üzerine içeriği (mM): 137 NaCl; 5,4 CsCl; 0,5 MgCl<sub>2</sub>; 1,8 CaCl<sub>2</sub>; 11,8 HEPES; 10 Glikoz ve pH 7,40 olan dış solüsyon uygulandı. Patch-clamp amplifikatörünün (Axon 200B, Molecular Devices, USA) voltaj kenetleme modunda 3 kHz'lik filtreden geçirilen Ca<sup>2+</sup> akımları, Digidata 1200'ün 5 kHz'lik örnekleme hızında pClamp yazılımı (Axon Instrument, Foster City CA, USA) ile kaydedildi. Ayrıca Clampfit 10.2 yazılımı ile akımlar analiz edildi.

Elde edilen her akımın tepe değerleri ile kuyruk akımları birbirinden çıkartılarak hesaplandı. Daha sonra her potansiyel için elde edilen akımlar hücrenin sığasına

(kapasitans) bölünerek değerlendirildi ve tüm gruplar için akım değerleri akım yoğunluğunun voltaja göre değişimi olarak verildi.

### **3.7. Protein Ekspresyonlarının Analizi**

Doku homojenatlarının hazırlanması için her gruptan alınan kalp dokuları sıvı nitrojen yardımıyla ezildi. Ezilen kalp dokuları içeriği ((mM): 20 Tris HCl; 150 NaCl; 2 KCl; 2 EDTA; 0,5 DDT; 1 Sodyum Orthovande; 20 NaF; 1 EGTA; 100 Proteaz inhibitörü; 0,4 PMSF) olan homojenizasyon tamponuna konuldu. Daha sonra ince bıçaklı homojenizatör yardımıyla parçalandı. Homojen hale gelen numuneler 10,000×g'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatantlar alındı. Ardından her grubun protein miktarı Bradford yöntemi ile tayin edildi.

Her grubun protein miktarı belirlendikten sonra grupların atriyal natriüretik peptit (ANP), SERCA, PLB, p-PLB, CaMKII, p-CaMKII, Nox2, p-22phox, p-47phox protein ekspresyonlarını belirleyebilmek için western blotting yöntemi kullanıldı. İlk olarak ekspresyonları belirlenecek proteinlerin moleküler ağırlıklarına (kDa) göre %12 veya %15 konsantrasyona sahip jel hazırlandı ve hazırlanan jelin kuyucuklarına eşit miktarda protein (20 µg/ml) yüklendi. Jele yüklenen proteinler, içeriği 28,83 gr glycine, 6,06 gr Tris, 2 gr SDS olan solüsyon içerisinde elektroforez cihazı (Hoefer, USA) ile elektrik alan oluşturularak kDa'larına göre ayrıldılar. Jel elektroforezi ile ayrıştırılan proteinler transfer sistemi (Trans-Blot Turbo BioRad) ile 25 V 1,3 mA 25 dakika poliviniliden diflorür (PVDF) membrana transfer edildi. Transfer işleminin ardından membran %3'lük oranında hazırlanan süt tozu solüsyonu ile 1 saatlik bloklama işlemi yapıldı. Ardından ortamdaki süt tozunu uzaklaştırmak için 20 dk boyunca tampon solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra membranlar %3'lük bovine albümin serum (BSA) solüsyonu içerisinde SERCA 1:3000 (SantaCruz, sc-73022), PLB 1:1000 (SantaCruz, sc393990), p-PLB 1:1000 (cell signaling 8496), CaMKII 1:1000 (Abcam, ab22609), p-CaMKII 1:1000 (Abcam, ab32678), Nox2 1:1000 (Abcam, ab129068), p-22phox 1:1000 (SantaCruz, sc271968), p-47phox 1:1000 (SantaCruz, 17845), ANP 1:2000 (SantaCruz, sc515701) ve GAPDH 1:10000 (Thermo Fisher Scientific, GA1R) primer antikoru oranları hazırlanıp bir gece boyunca inkübe edildi. Daha sonra, ortamdaki primer antikoru uzaklaştırmak için 20 dk boyunca tampon solüsyonu ile yıkandı. Ardından membranlar %3'lük BSA solüsyonu içerisinde primer antikora uygun olarak goat anti-mouse IgG (SantaCruz, sc2031) ya da goat anti-rabbit IgG (SantaCruz, sc2004) ile birleşen Horseradish peroksidaz sekonder

antikor kullanıldı. Bir saat boyunca membran sekonder antikor ile inkübe edildi. Ardından ortamdan sekonder antikorunu uzaklaştırmak için 20 dk boyunca tampon solüsyonla yıkandı. Sekonder antikor uygulamasının ardından yıkanan membranlar kemilüminesans ile 5 dakika muamele edildi. Daha sonra membranlar filme maruz bırakıldı. Sonuçlar Image J yazılımı kullanılarak analiz edildi ve grupların protein ekspresyon miktarları hedef protein ile eşlenen GAPDH'in oranlanmasıyla belirlendi.

### **3.8. Protein Karbonil Analizi**

Deney gruplarının protein karbonil ölçümü kit yardımıyla yapıldı (Cat. #10005020. Cayman Chemical Ann Arbor, MI USA). 2,4-dinitrophenylhydrazin (DNPH) ile protein karboniller reaksiyona girerek protein hidrazon bileşiklerinin oluşmasına neden olur. Oluşan protein-hidrazon miktarı, spektrofotometrik olarak 360-385 nm aralığındaki bir absorbansta ölçülür. Karbonil içeriği daha sonra protein konsantrasyonuna standardize edilir. Reaktif olarak hidroklorik asit (HCl), DNPH, TCA solüsyonu, guanidin hidroklorür, etanol ve etil asetat kullanıldı. Dondurulan kalp dokuları 1 mM EDTA bulunan 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH=6.7) soğuk solüsyonunda parçalandı (PRO 200 Homogenizater). Daha sonra parçalanmış dokular 4 °C'de 10,000×g'de 15 dk boyunca santrifüj edildi ve süpernatantlar alındı. Her örnekten alınan 400 µl'nin 200 µl'si örnek tüpe, diğer kısmı kontrol tüpe olmak üzere ikiye ayrıldı. Örnek tüpüne 800 µl DNPH, kontrol tüpüne 800 µl 2.5 M HCl ilave edilerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildi. Daha sonra bütün tüplere 1 ml %20 TCA ilave edildi ve ardından vortex yapıldı. %20 TCA eklenen tüpler buz üzerine yerleştirilerek 5 dk boyunca inkübe edildi ve ardından 4 °C'de 10,000×g'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatantlar uzaklaştırıldı. Tüm tüplere 1 ml %10 TCA ilave edilerek buz üzerinde 5 dk boyunca inkübe edildi ve ardından 4 °C'de 10,000×g'de 10 dk santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar atıldı ve 1 ml etanol/etil asetat karışımı eklendi ve ardından 4 °C'de 10,000×g'de 10 dk santrifüj edildi. Bu basamak birkaç kez tekrar edildikten sonra protein pelletlerine 500 µl guanidin hidroklorür eklendi, vortex edildi ve 4 °C'de 10,000×g'de 10 dk santrifüj edildi. Son olarak hem örnek tüplerden hem de kontrol tüplerden iki tane olmak üzere kuyularına yüklendi. Plate okuyucu kullanılarak 360-385 nm arasında dalga boyundaki absorbanlar ölçüldü. Elde edilen değerlerle protein karbonil miktarları hesaplandı.

### **3.9. Kullanılan Kimyasallar**

EA (4,4',5,5',6,6'-Hexahydroxydiphenic acid 2,6,2',6'-dilactone) (Sigma-Aldrich, E2250), İSO (Sigma-Aldrich, I6504), Kollejenaz A (Roche), Proteaz İnhibitör (Roche), Fura-2AM (Molecular Probes) kimyasal malzemeler kullanıldı. Ayrıca NaCl, KCl, HEPES, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Glikoz, Taurine, CsCl, Cs-Aspartat, Tris-HCl, EDTA, DTT, Sodyum Orthovande, NaF, PMSF, Glycine, SDS ve BSA malzemeleri Sigma-Aldrich tarafından temin edildi.

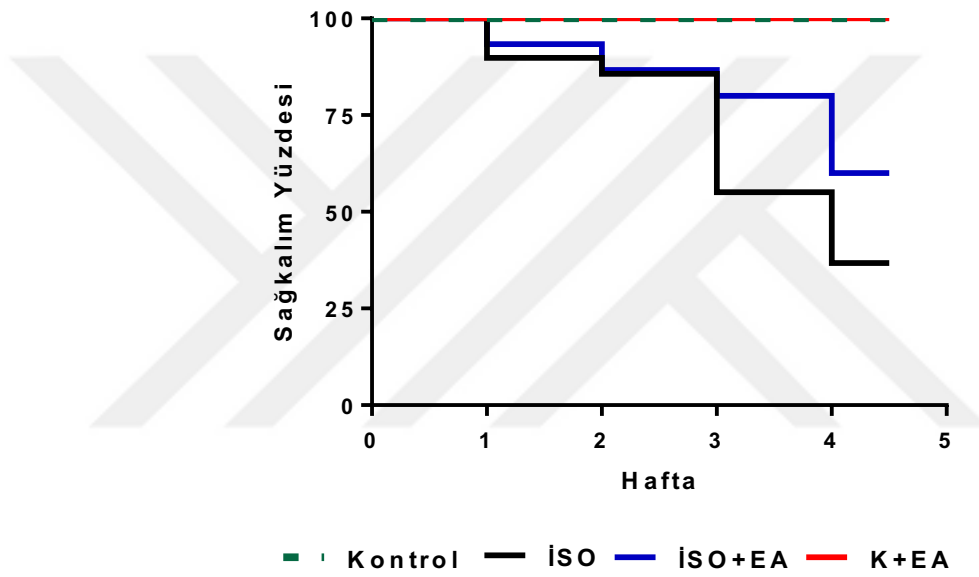
### **3.10. İstatiksel Analiz**

Normal dağılım varsayımı Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi. Grup karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Tek yönlü varyans analizi sonrasında çoklu karşılaştırmalar için Tukey Post-Hoc testi kullanıldı. Değişkenler ortalama  $\pm$  standart hata olarak özetlendi. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi 0,05 olarak belirlendi. Tüm istatistiksel analizler SPSS 20.0 istatistik paket programı kullanılarak gerçekleştirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Deney Hayvanlarının Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri

4 haftalık uygulama süresince İSO uygulanan gruplarda ölüm görülürken, Kontrol ve K+EA uygulanan gruplarda ölüm olayı görülmedi. İSO grubunda 4 haftalık uygulama süresi sonunda sağkalım %35,41 olarak gerçekleşirken, İSO+EA grubunda ise sağkalım %58,62 olarak gerçekleşmiştir. Böylece, EA uygulanan İSO grubunda sağkalım yüzdesinin sadece İSO uygulanan gruba göre anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1. Deney gruplarının 4 haftalık süreçte sağkalım yüzdesinin değişimi.

Grupların 4 haftalık deney süresinin başında ve sonunda ölçülen vücut ağırlıkları ile birlikte yüzde değişimleri Tablo 4.1'de verildi. Ortalama vücut ağırlıkları incelendiğinde başlangıçta deney grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ( $p=0,510$ ). Bununla birlikte, tüm çalışma gruplarında 4 haftalık deney süresi sonunda vücut ağırlıklarında artış olduğu gözlemlendi. İSO grubunda Kontrol grubuna göre vücut ağırlığının yüzde değişiminde istatistiksel açıdan anlamlı olmamakla birlikte bir miktar düşüş gözlemlendi (Kontrol: %17,14, İSO: %13,89).



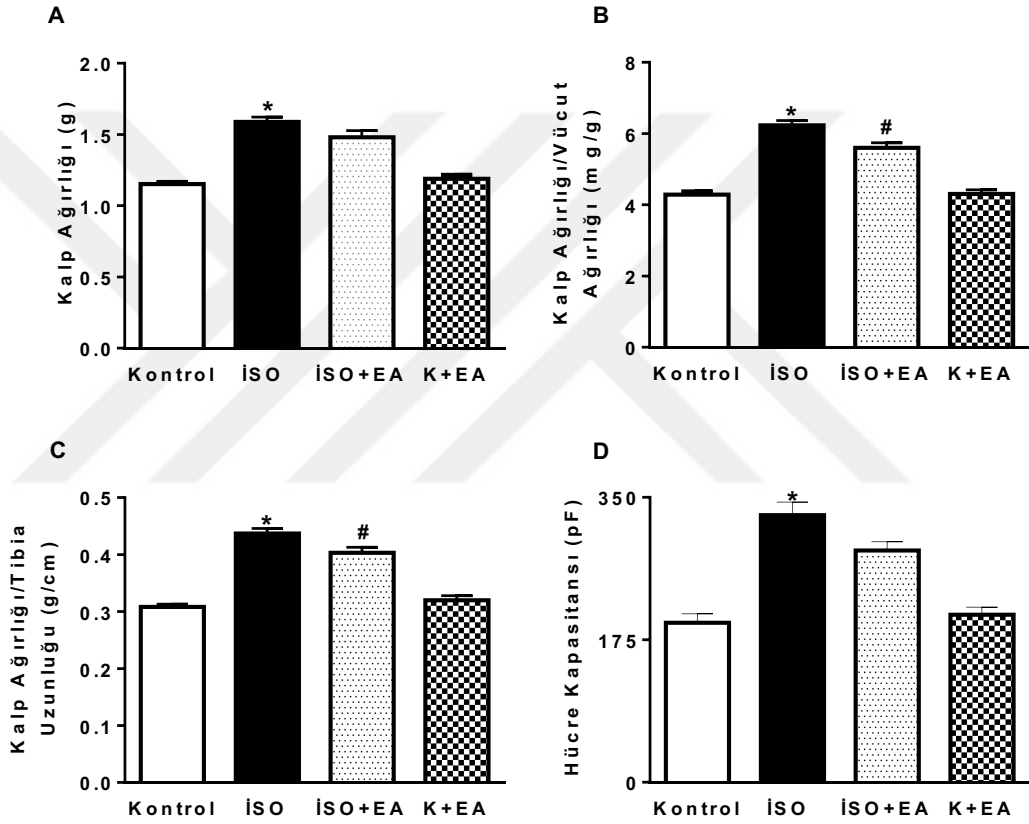
**Tablo 4. 1.** Deney gruplarının ilk ve son vücut ağırlıkları.

| Grup    | İlk kilo    | Son kilo    | Yüzde değişim |
|---------|-------------|-------------|---------------|
| Kontrol | 230,11±3,54 | 269,56±4,17 | %17,14        |
| İSO     | 224,88±5,42 | 256,12±5,58 | %13,89        |
| İSO+EA  | 230,53±8,88 | 265,00±8,98 | %14,95        |
| K+EA    | 238,61±3,02 | 276,72±5,04 | %15,97        |

Değer ortalama±standart hata olarak verildi. Sırasıyla Kontrol, İSO, İSO+EA, K+EA grupları için n=18, 17, 17, 18.

4 haftalık İSO uygulamasının sonucunda kardiyak hipertrofinin gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için kalp ağırlığı, kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranı, kalp ağırlığı/tibia uzunluğu oranı incelendi. İlk olarak gruplar arasında kalp ağırlığı incelendiğinde; İSO grubunda Kontrol grubuna göre kalp ağırlığında anlamlı bir artış olduğu görülürken (Kontrol: 1,15±0,02 g; İSO: 1,59±0,03 g p<0,001), İSO+EA grubunda ise artmış olan kalp ağırlığında anlamlı bir değişiklik görülmedi (İSO: 1,59±0,03 g; İSO+EA: 1,48±0,05 g, p=0,11). K+EA grubu ile Kontrol grubu arasında kalp ağırlığı bakımından anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (Kontrol: 1,15±0,02 g; K+EA: 1,19±0,03 g, p=0,87). Gruplar arasında kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranı incelendiğinde; İSO grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu görülürken (Kontrol: 4,29±0,09 mg/g; İSO: 6,23±0,14 mg/g, p<0,001), İSO+EA grubunda ise kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranında anlamlı bir azalma görüldü (İSO: 6,23±0,14 mg/g; İSO+EA: 5,60±0,14 mg/g, p<0,01). K+EA grubu ile Kontrol grubu arasında kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranı bakımından anlamlı bir farkın olmadığı gözlemlendi (Kontrol: 4,29±0,09 mg/g; K+EA: 4,31±0,11 mg/g, p=0,99). Gruplar arasında kalp ağırlığı/tibia uzunluğu oranı incelendiğinde; İSO grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı bir artış olduğu görülürken (Kontrol: 0,308±0,005 g/cm; İSO: 0,437±0,009 g/cm, p<0,001), İSO+EA grubunda ise kalp ağırlığı/tibia uzunluğu oranında anlamlı bir azalma görüldü (İSO: 0,437±0,009 g/cm; İSO+EA: 0,403±0,012 g/cm, p<0,05). K+EA grubu ile Kontrol grubu arasında kalp ağırlığı/tibia uzunluğu oranı bakımından anlamlı bir farkın olmadığı gözlemlendi (Kontrol: 0,308±0,005 g/cm; K+EA: 0,322±0,008 g/cm, p=0,669). Bu durumda, İSO uygulanan sıçanlarda miyokardiyal büyümenin gerçekleştiği ve EA'nın İSO-indüklü kardiyak hipertrofiyi önleme konusunda etkili olabileceği görülmektedir. Tüm sonuçlar bar grafiği olarak Şekil 4.2A-C'de gösterildi. Ayrıca hücresel düzeyde, kardiyomiyosit boyutundaki artışı belirlemek için hücre kapasitansları incelendi ve İSO grubunda Kontrol grubuna

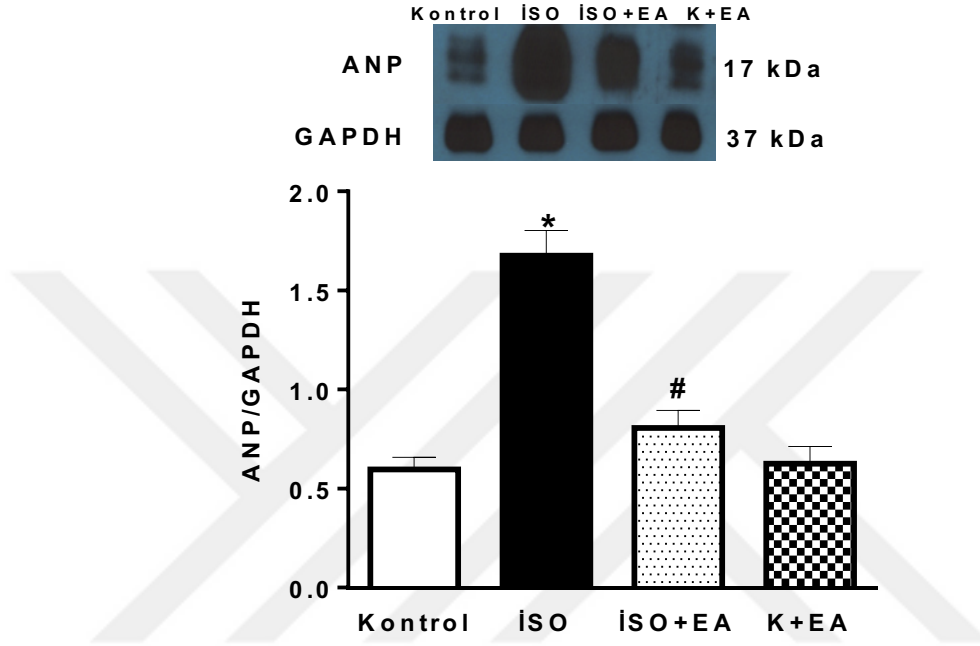
göre hücre kapasitanslarının anlamlı derecede arttığı görüldü (Kontrol: 196,07±10,98 pF; İSO: 328,23±16,01 pF, p<0,001). Hücre kapasitansları bakımından İSO+EA grubunda ise dikkat çekici bir azalma olmasına karşın bu azalmanın anlamlı bir seviyeye ulaşmadığı görüldü (İSO: 328,23±16,01 pF; İSO+EA: 248,76±10,71 pF, p=0,06). Böylece, İSO uygulaması hipertrofiye neden olurken, uzun süreli EA uygulamasının organ düzeyinde hipertrofiyi anlamlı derecede geri çevirdiği görüldü. Ancak, hücresel boyutta bu düzelleme istatistiksel anlamlılık gösterecek seviyeye ulaşmadı. Sonuçlar bar grafiği olarak Şekil 4.2D’de gösterildi.



**Şekil 4. 2.** Ellagik asid uygulamasının kardiyak hipertrofi parametrelerine etkisi. A) Kalp ağırlığı, B) Kalp Ağırlığı/Vücut Ağırlığı, C) Kalp Ağırlığı/Tibia Uzunluğu, D) Kapasitans. Değerler ortalama ± standart hata olarak verildi. Kalp Ağırlığı, Kalp Ağırlığı/Vücut Ağırlığı, Kalp Ağırlığı/Tibia Uzunluğu için sırasıyla Kontrol, İSO, İSO+EA, K+EA grupları n=18, 17, 17, 18. Kapasitans için sırasıyla Kontrol, İSO, İSO+EA, K+EA grupları n= 18, 26, 26, 23. Kontrol grubundan fark \*p<0,05; İSO grubundan fark #p<0,05.

Çalışmamızda miyokard hipertrofinin ve fetal gen programının aktivasyonunun moleküler düzeydeki belirteci olan ANP ekspresyonu da değerlendirildi. İSO uygulaması ANP üretimini aktive etmekte ve böylece kardiyak hipertrofi oluşumunu hızlandırmaktadır. ANP protein ekspresyon seviyeleri deney grupları arasında değerlendirildiğinde; İSO grubunda Kontrol grubuna göre dramatik şekilde arttığı

(Kontrol:  $0,60 \pm 0,06$ ; İSO:  $1,67 \pm 0,13$ ,  $p < 0,001$ ) ve İSO+EA grubunda ANP'nin artan ekspresyon seviyesinin anlamlı düzeyde azaldığı (İSO:  $1,67 \pm 0,13$ ; İSO+EA:  $0,81 \pm 0,09$ ,  $p < 0,001$ ) görülürken, Kontrol ile K+EA grubu arasında ANP ekspresyonu bakımından bir fark bulunmadı (Kontrol:  $0,60 \pm 0,06$ ; K+EA:  $0,63 \pm 0,09$ ,  $p = 1,00$ ) (Şekil 4.3).



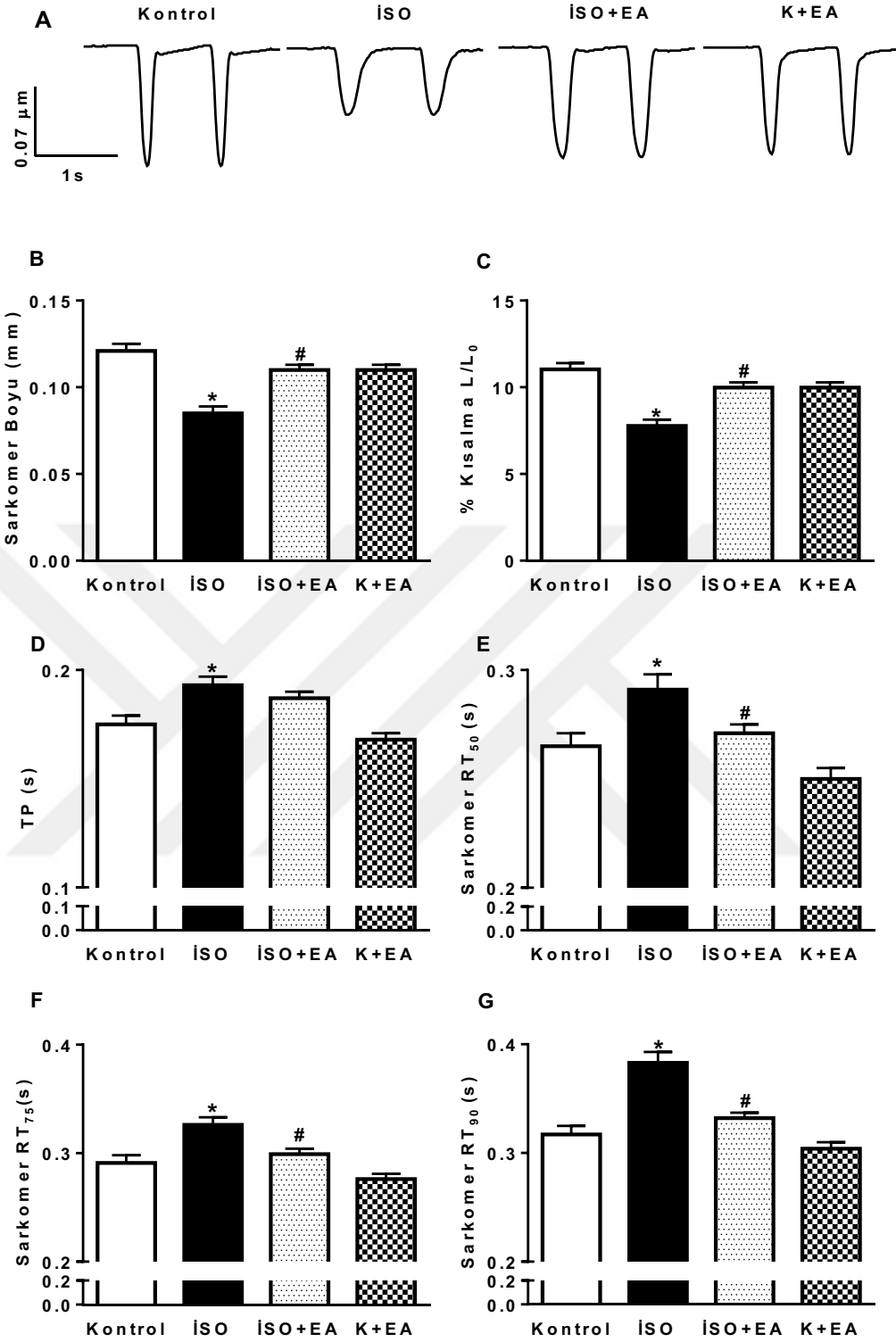
**Şekil 4. 3.** Deney gruplarının ANP protein ekspresyon analizi ve wesetrn blot görüntü örneği. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. Tüm gruplar için  $n=8$ , Kontrol grubundan fark \* $p < 0,001$ , İSO grubundan fark # $p < 0,001$ .

#### 4.2. Kasılma Parametreleri

Patolojik kardiyak hipertrofi sırasında gerçekleşen fonksiyonel bozuklukları ve EA'nın bu sürece etkisini belirlemek için kardiyomiyositlerde kasılma yanıtları incelendi. Kardiyomiyositlerin fraksiyonel kısalmaları 0,5 Hz frekansa ve 5-7 V genliğe sahip elektriksel alan uyarısı altında kaydedildi. Şekil 4.4A'da grupların örnek kasılma yanıtları gösterilmektedir. İlk olarak dinlenim halindeki sarkomer boyu incelendiğinde; İSO grubunda uzunluğun Kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı (Kontrol:  $0,121 \pm 0,004 \mu\text{m}$ ; İSO:  $0,085 \pm 0,004 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,001$ ), İSO+EA grubunda bu değişikliğin düzeldiği (İSO:  $0,085 \pm 0,004 \mu\text{m}$ ; İSO+EA:  $0,110 \pm 0,003 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,001$ ), K+EA grubunda ise sarkomer boyunda Kontrole göre anlamlı bir değişikliğin olmadığı görüldü (Kontrol:  $0,121 \pm 0,004 \mu\text{m}$ ; K+EA:  $0,110 \pm 0,003 \mu\text{m}$ ,  $p = 0,181$ ) (Şekil 4.4B). Ayrıca, gruplar arasında fraksiyonel kısalma miktarları incelendi. Fraksiyonel kısalmanın İSO grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı olarak

azaldığı (Kontrol:  $11,03 \pm 0,36$ ; İSO:  $7,77 \pm 0,37$ ,  $p < 0,001$ ) görülürken, İSO+EA grubunda bu azalmanın anlamlı seviyede düzeldiği (İSO:  $7,77 \pm 0,37$ ; İSO+EA:  $9,98 \pm 0,30$ ,  $p < 0,001$ ), K+EA grupta ise fraksiyonel kılma miktarında Kontrole göre anlamlı bir değişikliğin olmadığı görüldü (Kontrol:  $11,03 \pm 0,36$ ; K+EA:  $9,98 \pm 0,30$ ,  $p = 0,14$ ) (Şekil 4.4C).

Daha sonra gruplar arasında kasılma ve relaksasyon hızlarındaki değişim miktarını belirlemek için TP, RT<sub>50</sub>, RT<sub>75</sub> ve RT<sub>90</sub> incelendi. İlk olarak TP parametresi incelendiğinde; İSO grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede uzadığı (Kontrol:  $0,175 \pm 0,004$  s; İSO:  $0,193 \pm 0,004$  s,  $p < 0,005$ ) ve İSO+EA grubunda da bu uzamanın anlamlı bir değişiklik göstermediği görüldü (İSO:  $0,193 \pm 0,004$  s; İSO+EA:  $0,187 \pm 0,003$  s,  $p = 0,659$ ). K+EA grubu ile Kontrol grubunun TP'leri karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Kontrol:  $0,175 \pm 0,004$  s; K+EA:  $0,168 \pm 0,003$  s,  $p = 0,560$ ). Miyositlerin gevşeme süreci incelendiğinde; İSO grubunun Kontrole göre RT<sub>50</sub>, RT<sub>75</sub> ve RT<sub>90</sub> ulaşma sürelerinin anlamlı derecede uzadığı belirlendi (RT<sub>50</sub> Kontrol:  $0,265 \pm 0,006$  s; İSO:  $0,291 \pm 0,007$  s,  $p < 0,01$ ; RT<sub>75</sub> Kontrol:  $0,291 \pm 0,007$  s; İSO:  $0,326 \pm 0,007$  s;  $p < 0,002$ ; RT<sub>90</sub> Kontrol:  $0,317 \pm 0,008$  s; İSO:  $0,383 \pm 0,010$  s,  $p < 0,001$ ). İSO+EA grubunda ise RT<sub>50</sub>, RT<sub>75</sub> ve RT<sub>90</sub>'na ulaşma sürelerindeki uzamanın azaldığı gözlemlendi (RT<sub>50</sub> İSO:  $0,291 \pm 0,007$  s; İSO+EA:  $0,271 \pm 0,004$  s,  $p < 0,05$ ; RT<sub>75</sub> İSO:  $0,326 \pm 0,007$  s; İSO+EA:  $0,299 \pm 0,005$  s,  $p = 0,01$ ; RT<sub>90</sub> İSO:  $0,383 \pm 0,010$  s; İSO+EA:  $0,332 \pm 0,005$  s,  $p < 0,001$ ). K+EA grubunda ise relaksasyon sürelerinde Kontrol grubuna göre bir değişikliğin olmadığı görüldü (RT<sub>50</sub> Kontrol:  $0,265 \pm 0,006$  s; K+EA:  $0,250 \pm 0,005$  s,  $p = 0,265$ ; RT<sub>75</sub> Kontrol:  $0,291 \pm 0,007$  s; K+EA:  $0,276 \pm 0,005$  s,  $p = 0,320$ ; RT<sub>90</sub> Kontrol:  $0,317 \pm 0,008$  s; K+EA:  $0,304 \pm 0,006$  s,  $p = 0,670$ ) (Şekil 4.4D-G). Bu bulgular, patolojik kardiyak hipertrofi sonucunda meydana gelen fonksiyonel bozukluklarda EA'nın iyileştirici bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.



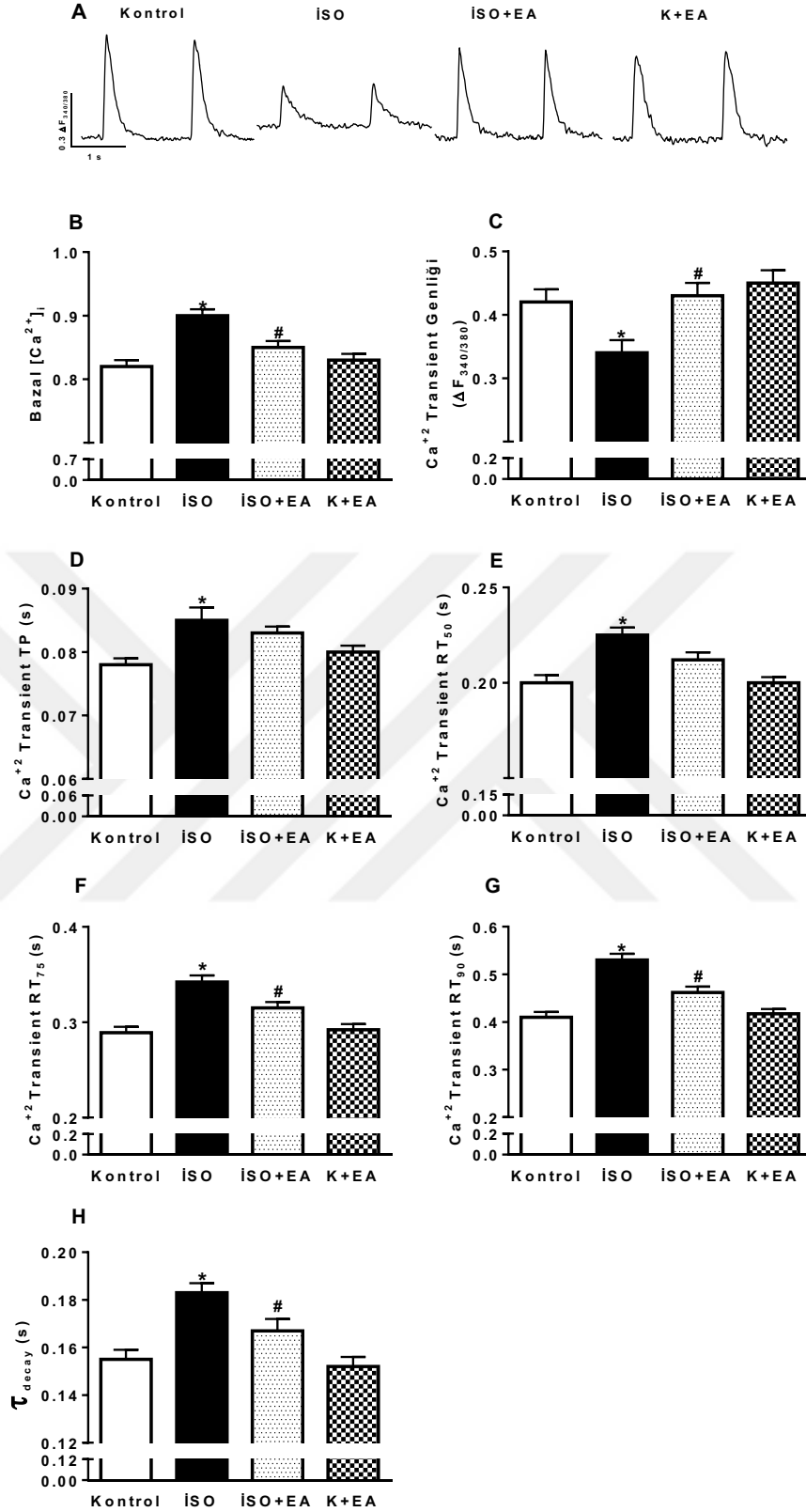
**Şekil 4. 4.** Kardiyomiyositlerin elektriksel alan uyarısı altında kaydedilen kasılma parametreleri. A) Deney gruplarının elektriksel alan uyarısı altında ventrikül miyosiyelerinden kaydedilen kasılma traseleri. B) Diyastolik durumdaki sarkomer boyu. C) Fraksiyonel kısalma oranı. D) Kasılmanın maksimuma ulaşma süresi. E) Relaksasyonun %50'sine ulaşma süresi. F) Relaksasyonun %75'ine ulaşma süresi. G) Relaksasyonun %90'nına ulaşma süresi. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. Sırasıyla Kontrol, İSO, İSO+EA, K+EA grupları için n=90, 118, 106, 115 kardiyomiyosit, Kontrol grubundan fark \*p<0,05; İSO grubundan fark #p<0,05.

### 4.3. Hücre İçi $Ca^{2+}$ Transientleri

Bu aşamada gruplar arasındaki kasılma parametrelerindeki değişimin, kasılma ve gevşeme sırasında hücre içine salınan ve geri alınan  $[Ca^{2+}]_i$  miktarıyla ilişkisi araştırıldı. Bunun için 0,5 Hz frekansa ve 5-7 V genliğe sahip elektriksel alan uyarısı altında fura-2AM ile yüklenmiş kardiyomiyositlerden hücre içi ortamda değişen  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunu ve kinetiklerini belirlemek için  $[Ca^{2+}]_i$  transientleri kaydedildi. Şekil 4.5A'da grupların örnek  $[Ca^{2+}]_i$  transientleri verildi. İlk olarak grupların diyastolik durumdaki hücre içi bazal  $Ca^{2+}$  konsantrasyonu incelendiğinde; İSO grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede artış olduğu görülürken (Kontrol:  $0,82 \pm 0,01$ ; İSO:  $0,90 \pm 0,01$ ,  $p < 0,001$ ), İSO+EA grubunda bu değişikliğin düzeldiği görüldü (İSO:  $0,90 \pm 0,01$ ; İSO+EA:  $0,85 \pm 0,01$ ,  $p = 0,002$ ). Buna karşılık, K+EA grubu ile Kontrol grubu arasında diyastolik hücre içi  $Ca^{2+}$  seviyesi bakımından bir fark görülmedi (Kontrol:  $0,82 \pm 0,01$ ; K+EA:  $0,83 \pm 0,01$ ,  $p = 0,83$ ) (Şekil 4.5B).

Diğer yandan, İSO grubunun  $Ca^{2+}$  transient genliğinin Kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı (Kontrol:  $0,42 \pm 0,02$ ; İSO:  $0,34 \pm 0,02$ ,  $p < 0,02$ ) ve 4 haftalık EA uygulamasının  $Ca^{2+}$  transient genliğindeki azalmayı önemli oranda düzelttiği görüldü (İSO:  $0,34 \pm 0,02$ ; İSO+EA:  $0,43 \pm 0,02$ ,  $p < 0,003$ ).  $Ca^{2+}$  transient genliği bakımından EA uygulanan ve uygulanmayan Kontrol sıçanlarının miyositleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Kontrol:  $0,42 \pm 0,02$ ; K+EA:  $0,45 \pm 0,02$ ,  $p = 0,78$ ) (Şekil 4.5C).  $Ca^{2+}$  transientlerinin tepeye ulaşma süreleri ( $Ca^{2+}$  transient TP) incelendiğinde; İSO grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede uzama olduğu görülürken (Kontrol:  $0,078 \pm 0,001$  s; İSO:  $0,085 \pm 0,002$  s,  $p < 0,001$ ), İSO+EA grubunda tepeye çıkış süresinde bir düzelme gözlenmedi (İSO:  $0,085 \pm 0,002$  s; İSO+EA  $0,083 \pm 0,001$  s,  $p = 0,469$ ). Kontrol ile K+EA gruplarının TP değerleri arasında da anlamlı bir fark tespit edilmedi (Kontrol:  $0,078 \pm 0,001$  s; K+EA:  $0,080 \pm 0,001$  s,  $p = 0,742$ ) (Şekil 4.5D).  $Ca^{2+}$  transientleri için relaksasyonun %50, 75 ve 90'ına ulaşma süreleri ( $Ca^{2+}$  transient  $RT_{50}$ ,  $RT_{75}$  ve  $RT_{90}$ ) incelendiğinde; İSO grubunda Kontrole göre  $Ca^{2+}$  transientleri için relaksasyonun %50, 75 ve 90'ına ulaşma süreleri anlamlı derecede uzadı ( $RT_{50}$  Kontrol:  $0,200 \pm 0,004$  s; İSO:  $0,225 \pm 0,004$  s;  $RT_{75}$  Kontrol:  $0,289 \pm 0,006$  s; İSO:  $0,342 \pm 0,007$  s;  $RT_{90}$  Kontrol:  $0,410 \pm 0,011$  s; İSO:  $0,530 \pm 0,013$  s,  $p < 0,001$ ). İSO+EA grubunda  $RT_{50}$ 'ye ulaşma süresinde anlamlı bir azalma görülmezken ( $RT_{50}$  İSO:  $0,225 \pm 0,004$  s; İSO+EA:  $0,212 \pm 0,004$  s,  $p = 0,064$ ),  $RT_{75}$  ve  $RT_{90}$ 'da sürenin azalmanın anlamlı bir seviyeye ulaştığı görüldü ( $RT_{75}$  İSO:  $0,342 \pm 0,007$  s; İSO+EA:

0,315±0,006 s, p<0,01; RT<sub>90</sub> İSO: 0,530±0,013 s; İSO+EA: 0,462±0,012 s, p<0,001). K+EA grubu ile Kontrol grubu arasında Ca<sup>2+</sup> transientleri için relaksasyonun süreleri bakımından bir fark bulunamadı (RT<sub>50</sub> Kontrol: 0,200±0,004 s; K+EA: 0,200±0,003 s, p=0,999; RT<sub>75</sub> Kontrol: 0,289±0,006 s; K+EA: 0,292±0,006 s, p=0,978; RT<sub>90</sub> Kontrol: 0,410±0,011 s; K+EA: 0,417±0,010 s, p=0,973) (Şekil 4.5E-G). Gruplar arasında Ca<sup>2+</sup> transientlerinin zaman sabitine ulaşma süreleri açısından incelendiğinde; İSO grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede uzadığı görülürken (Kontrol: 0,155±0,004 s; İSO: 0,183±0,004 s, p<0,001), İSO+EA grubunda bu sürenin azaldığı görüldü (İSO: 0,183±0,004 s; İSO+EA: 0,167±0,005 s, p<0,05). Kontrol grubu ile K+EA grupları arasında transientlerin zaman sabitine ulaşma süreleri bakımından anlamlı bir farkın olmadığı görüldü (Kontrol: 0,155±0,004 s; K+EA: 0,152±0,004 s, p=0,95) (Şekil 4.5H). Sonuçlar incelendiğinde kardiyak hipertrofi durumunda Ca<sup>2+</sup> döngüsünün bozulduğunun ve EA uygulamasıyla düzelebileceği görülmektedir.

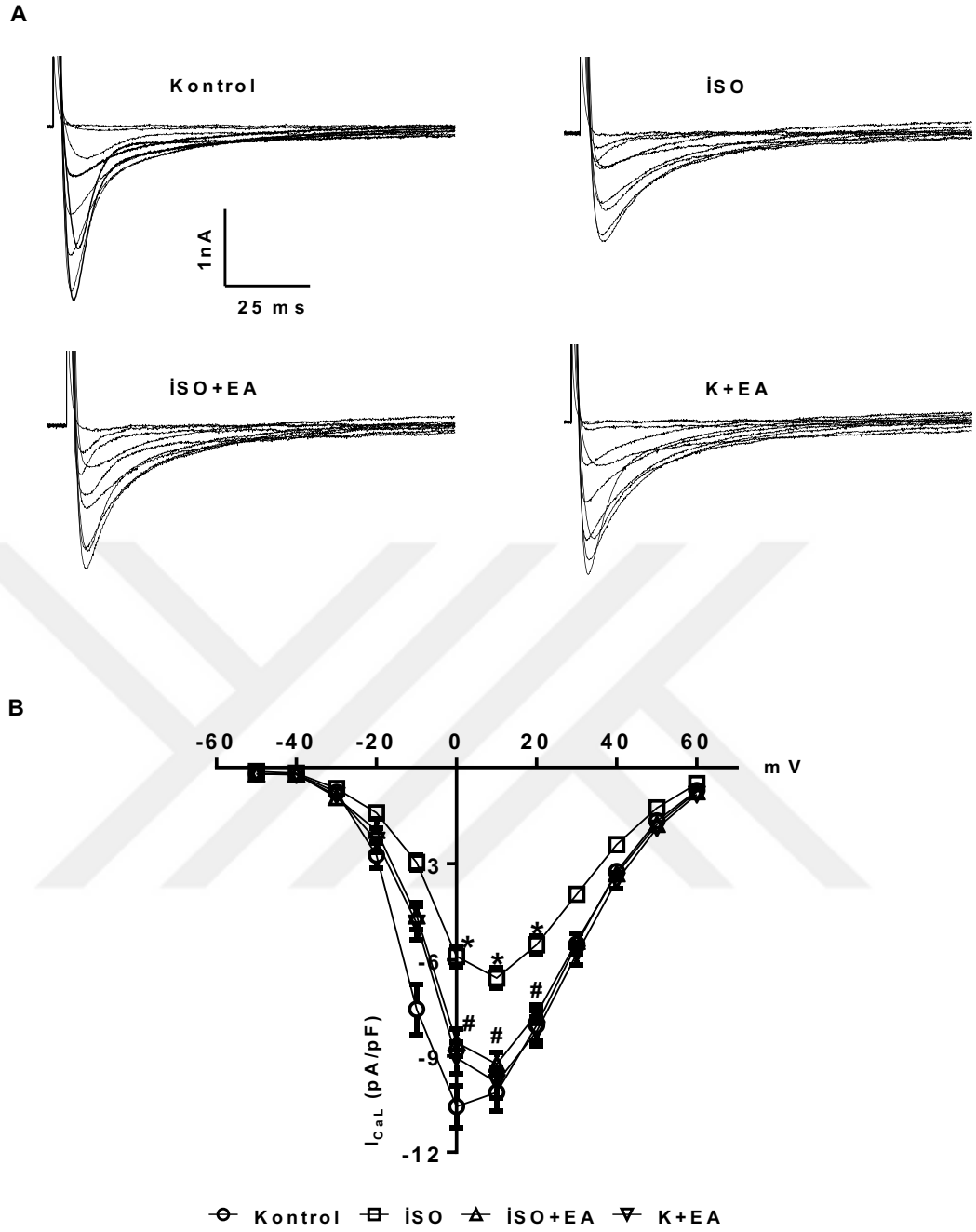


**Şekil 4. 5.** Kardiyomiyositlerin  $Ca^{2+}$  transiyent parametreleri. A) Deney gruplarının  $Ca^{2+}$  transiyent örnekleri. B) Hücre içi bazal  $Ca^{2+}$  seviyeleri. C)  $Ca^{2+}$  transiyenti genlikleri. D)  $Ca^{2+}$  transiyentlerin tepeye çıkış süreleri. E) Relaksasyonun %50'sine ulaşma süresi. F) Relaksasyonun %75'ine ulaşma süresi. G) Relaksasyonun %90'nına ulaşma süresi. H)  $Ca^{2+}$  transiyentlerinin zaman sabiti. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. Sırasıyla Kontrol, İSO, İSO+EA, K+EA grupları için n=69, 77, 70, 79 kardiyomiyosit. Kontrol grubundan fark \*p<0,05; İSO grubundan fark #p<0,05.



#### 4.4. Ca<sup>2+</sup> Akımları

Kardiyak kasılma, hücre içi Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonundaki değişimle düzenlenir. Bu durum AP'nin oluşturduğu depolarizasyon sonucunda L-tipi Ca<sup>2+</sup> kanallarının açılmasıyla başlar. L-tipi Ca<sup>2+</sup> kanallarından hücre içine çok küçük miktarda Ca<sup>2+</sup> girişi gerçekleşir. L-tipi Ca<sup>2+</sup> kanallarından giren Ca<sup>2+</sup> iyonlarının sitozolik konsantrasyonda oluşturabileceği değişim miyositlerde kasılma süreçlerinin yürütülmesi için yeterli değildir. Bu yüzden kanallar yoluyla giren Ca<sup>2+</sup> SR üzerinde bulunan RyR aracılığıyla sitozole Ca<sup>2+</sup> salınımını tetikler ve böylece bir amplifikasyon mekanizmasıyla Ca<sup>2+</sup> transientlerinin oluşumunu sağlar ve kasılmayı gerçekleştirir. Dolayısıyla L-tipi Ca<sup>2+</sup> kanalları aracılığıyla oluşan Ca<sup>2+</sup> akımları sadece AP'nin süresini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda uyarılma-kasılma çiftlenimini sürecinde de önemli bir rol oynar. Bu nedenle, Ca<sup>2+</sup> regülasyonunda böylesine etkili olan L-tipi Ca<sup>2+</sup> akımlarının nasıl değiştiğini değerlendirmek için her grupta L-tipi Ca<sup>2+</sup> akımları ölçüldü. Şekil 4.6A'da voltaj kenetleme yöntemiyle tüm gruplar için elde edilen Ca<sup>2+</sup> akım traseleri gösterilmiştir. Gruplardan elde edilen ortalama akım yoğunluklarının voltaja göre değişimi incelendiğinde; İSO grubunda akım yoğunluğunun Kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı (0 mV'ta Kontrol: -10,57±0,65 pA/pF; İSO: -5,89±0,32, p<0,001) İSO+EA grubunda ise bu azalmanın geri döndüğü gözlemlendi (0 mV'ta İSO: -5,89±0,32; İSO+EA: -8,57±0,42 pA/pF, p<0,001). Ayrıca, K+EA grubu ile Kontrol grubu arasında akım yoğunluğu bakımından anlamlı bir fark olmadığı görüldü (0 mV'ta Kontrol: -10,57±0,65 pA/pF; K+EA: -9,05±0,50 pA/pF, p=0,14) (Şekil 4.6B).

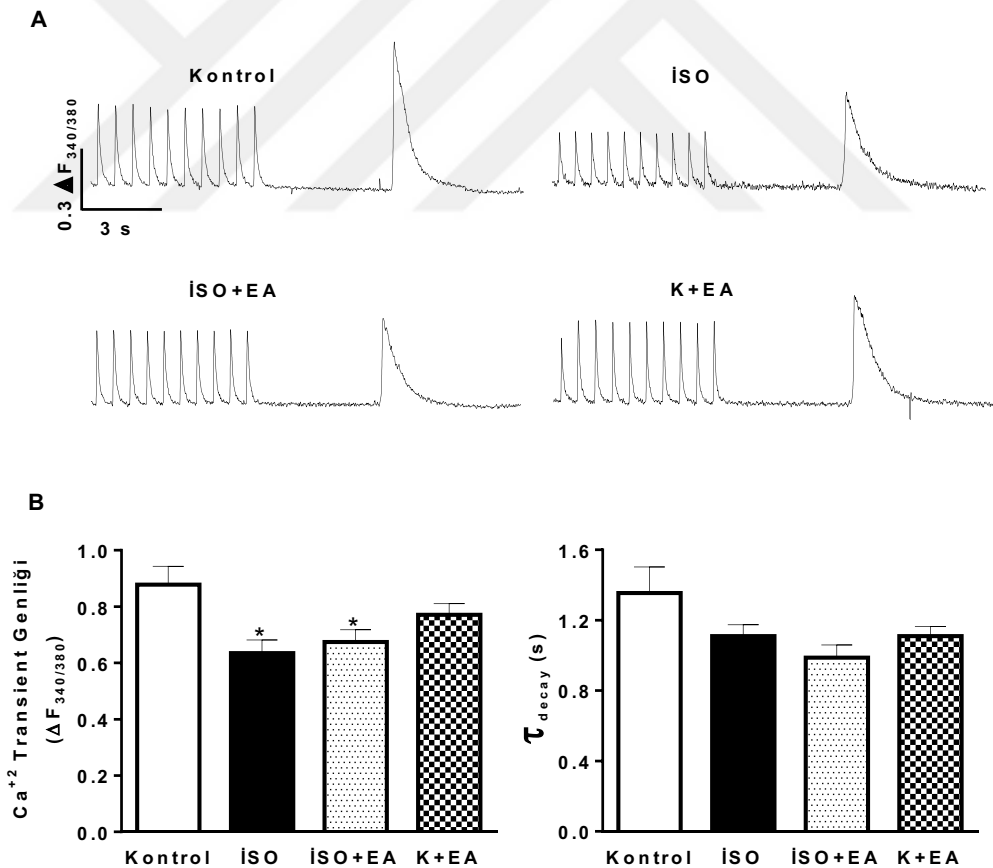


**Şekil 4.6.** Deney gruplarından elde edilen L-tipi  $Ca^{2+}$  akımlarının potansiyele göre değişimi. A) Gruplar için puls protokolüne göre kaydedilen  $Ca^{2+}$  örnek akım traseleri. Kayıtlar,  $-50$  mV'tan  $10$  mV'luk artışlarla  $+60$  mV'a  $300$  ms'lik depolarize edici pulslar uygulanarak  $12$  farklı voltaj seviyesinde kaydedildi. B) Ventrikül miyositlerinin deney grupları için ortalama voltaj-akım grafiği. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. Sırasıyla Kontrol, İSO, İSO+EA, K+EA grupları için  $n=15, 17, 17, 15$  miyosit. Kontrol grubundan fark \* $p<0,05$ ; İSO grubundan fark # $p<0,05$ .

#### 4.5. SR $Ca^{2+}$ Miktarı

Kasılma için gerekli olan  $Ca^{2+}$  iyonunun küçük bir bölümü L-tipi  $Ca^{2+}$  kanallarından hücre içine girerken, çok daha büyük bir kısmı SR'da depolanan  $Ca^{2+}$  iyonlarının uyarı neticesinde sitozolik kısma salınması ile karşılanmaktadır. Kasılmanın arkasından gelen relaksasyon sırasında sitozolde yükselen  $Ca^{2+}$  miktarını uzaklaştırmak için SR

üzerinde yer alan SERCA tarafından  $Ca^{2+}$  iyonları SR içerisine geri alınır. Bu nedenle SR,  $Ca^{2+}$  regülasyonunda önemli bir role sahiptir. Farklı gruplardan izole edilen miyositlerde SR'daki  $Ca^{2+}$  miktarını belirlemek için 10 mM'lık kafein uygulaması gerçekleştirildi. Şekil 4.7A'da hücre üzerine uygulanan 10 mM'lık kafeine karşılık oluşan yanıt traseleri gösterildi. Gruplar arasında SR'da depolanan  $Ca^{2+}$  miktarları değerlendirildiğinde; SR'daki  $Ca^{2+}$  miktarının İSO grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı (Kontrol:  $0,88\pm0,07$ ; İSO:  $0,63\pm0,05$ ,  $p<0,02$ ), İSO+EA grubunda SR'da depolanan  $Ca^{2+}$  miktarındaki azalmanın anlamlı düzeyde değişmediği (İSO:  $0,63\pm0,05$ ; İSO+EA:  $0,67\pm0,04$ ,  $p=0,95$ ), K+EA grubu ile Kontrol grubu arasında ise anlamlı farkın olmadığı görüldü (Kontrol:  $0,88\pm0,07$ ; K+EA:  $0,77\pm0,04$ ,  $p=0,42$ ) (Şekil 4.7B). SR'dan salınan  $Ca^{2+}$ 'ların geri alınma hızları incelendiğinde gruplar arasında anlamlı farkın olmadığı görüldü (Kontrol:  $1,35\pm0,15$  s; İSO:  $1,11\pm0,06$  s; İSO+EA:  $0,99\pm0,07$  s; K+EA:  $1,11\pm0,06$  s,  $p=0,06$ ) (Şekil 4.7C).

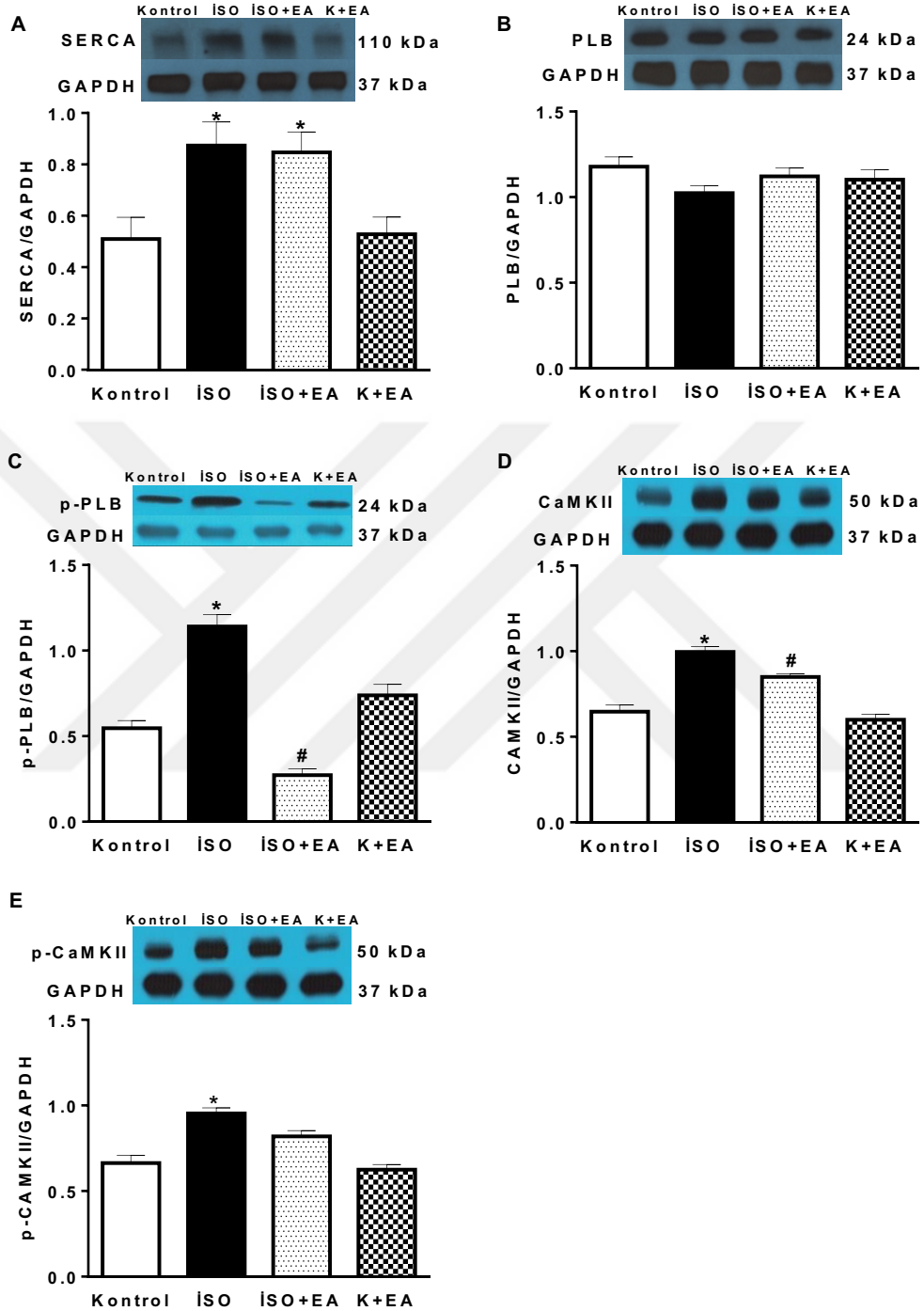


**Şekil 4. 7.** Deney gruplarına uygulanan 10 mM'lık kafeinin oluşturduğu  $Ca^{2+}$  transienleri ve SR  $Ca^{2+}$  yükü. A) Hücre üzerine uygulanan kafeinin oluşturduğu  $Ca^{2+}$  transienleriyle ilgili örnek kayıtlar. B) Kafein uygulaması sonucunda oluşan  $Ca^{2+}$  transientinin genliği C)  $Ca^{2+}$  transienti zaman sabiti. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. Sırasıyla Kontrol, İSO, İSO+EA, K+EA grupları için  $n=16, 17, 16, 20$ . Kontrol grubundan fark \* $p<0,05$ .

#### 4.6. Protein Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi ve Protein Karbonil Ölçümü

Fizyolojik koşullar altında hücre içi  $Ca^{2+}$  döngüsünün düzenlenmesinden sorumlu birçok protein mevcuttur. Bu nedenle kardiyak hipertrofi durumunda kasılmadaki ve hücre içi  $Ca^{2+}$  regülasyonundaki değişikliklerden sorumlu olan bu proteinlerin ekspresyonları da değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.8’de gösterildi. İlk olarak SERCA protein ekspresyonu değerlendirildiğinde; İSO grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derece ekspresyon seviyesinin arttığı bulundu (Kontrol:  $0,51\pm 0,08$ ; İSO:  $0,87\pm 0,09$ ,  $p<0,03$ ). İSO+EA grubunda bu artışın değişmediği görüldü (İSO:  $0,87\pm 0,09$ ; İSO+EA:  $0,85\pm 0,08$ ,  $p=1,00$ ). Ayrıca Kontrol ile K+EA grupları arasında SERCA protein ekspresyonu miktarında anlamlı bir fark bulunmadı (Kontrol:  $0,51\pm 0,08$ ; K+EA:  $0,53\pm 0,07$ ,  $p=1,00$ ) (Şekil 4.8A). Daha sonra SERCA aktivitesinde önemli olan PLB ve p-PLB protein ekspresyonları ölçüldü ve gruplar arasında karşılaştırıldı. PLB protein ekspresyonu bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark görülmezken (Kontrol:  $1,18\pm 0,06$ ; İSO:  $1,02\pm 0,04$ , İSO+EA:  $1,12\pm 0,05$ ; K+EA:  $1,10\pm 0,06$ ,  $p=0,23$ ), p-PLB protein ekspresyonunun İSO grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı (Kontrol:  $0,55\pm 0,04$ ; İSO:  $1,14\pm 0,07$ ,  $p<0,001$ ) İSO+EA grubunda ise bu durumun anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi (İSO:  $1,14\pm 0,07$ ; İSO+EA:  $0,27\pm 0,04$ ,  $p<0,001$ ). Ayrıca, Kontrol grubu ile K+EA grubu arasında p-PLB protein ekspresyonu bakımından anlamlı bir fark bulunmadı (Kontrol:  $0,55\pm 0,04$ ; K+EA:  $0,74\pm 0,06$ ,  $p=0,09$ ) (Şekil 4.8B, C). CaMKII, uyarılma-kasılma çiftlenimde rol oynayan  $Ca^{2+}$  düzenleyici birçok proteini fosforile ettiğinden dolayı uyarılma-kasılma çiftlenimini etkiler. Bu yüzden CaMKII’nin ekspresyonunun patolojik kardiyak hipertrofisi, sırasında nasıl etkilendiği ve EA’nın bu duruma etkisi araştırıldı. CaMKII protein ekspresyonu gruplar arasında değerlendirildiğinde; İSO grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı bulundu (Kontrol:  $0,65\pm 0,04$ ; İSO:  $1,00\pm 0,03$ ,  $p<0,001$ ). İSO+EA grubunda protein ekspresyonunda anlamlı bir azalma gözlemlendi (İSO:  $1,00\pm 0,03$ ; İSO+EA:  $0,85\pm 0,02$ ,  $p<0,02$ ). Kontrol ve K+EA grupları arasında CaMKII protein ekspresyonu bakımından anlamlı bir fark bulunmadı (Kontrol:  $0,65\pm 0,04$ ; K+EA:  $0,60\pm 0,03$ ,  $p=0,69$ ) (Şekil 4.8D). Ayrıca, p-CaMKII ekspresyonu incelendiğinde, İSO grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede bir artış olduğu bulundu (Kontrol:  $0,66\pm 0,05$ ; İSO:  $0,95\pm 0,03$ ,  $p<0,001$ ). İSO+EA grubunda ise protein ekspresyonunda azalma gözlenmesine rağmen istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı (İSO:  $0,95\pm 0,03$ ; İSO+EA:  $0,82\pm 0,03$ ,  $p=0,06$ ). Kontrol ve K+EA

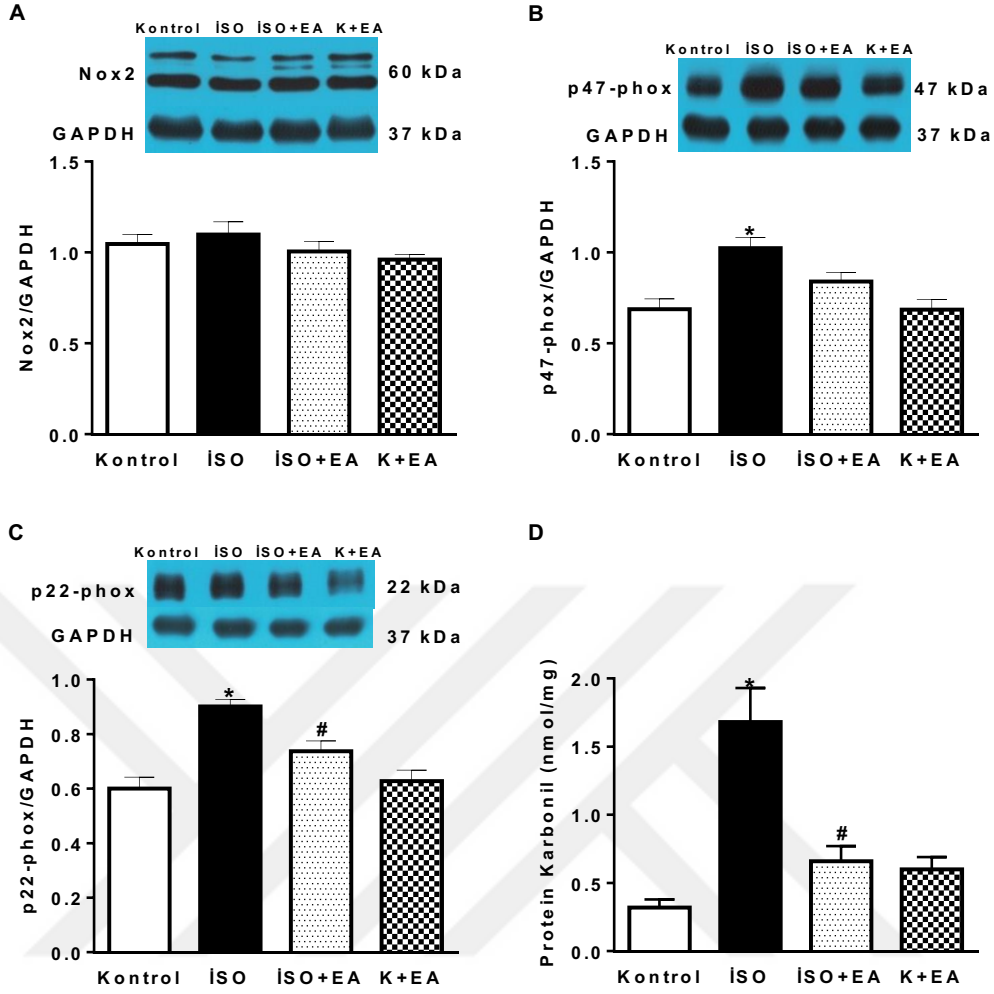
grupları arasında p-CaMKII ekspresyonu bakımından anlamlı bir fark görülmedi (Kontrol:  $0,66 \pm 0,05$ ; K+EA:  $0,62 \pm 0,03$ ,  $p=0,87$ ) (Şekil 4.8 E).



**Şekil 4.8.** Deney grupları için  $Ca^{2+}$  düzenleyici proteinlerin western blot görüntü örnekleri ve protein ekspresyon analizleri. A) SERCA (110 kDa), B) PLB (24 kDa), C) p-PLB (24 kDa), D) CaMKII (50 kDa) ve E) p-CaMKII (50 kDa) protein ekspresyon miktarları. Her protein ekspresyonu GAPDH ile normalize edildi. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. Tüm gruplar için  $n=8$ . Kontrol grubundan fark \* $p<0,001$ ; ISO grubundan fark \* $p<0,001$ .

ROT'lar hem fizyolojik hem de patolojik kardiyak iyon dengesinde görev almaktadır. ROT'lar uyarılma-kasılma çiftleniminin düzenlenmesinde görev alan proteinleri direk olarak ya da kinazlar aracılığıyla etkilemektedir. Bu nedenle kardiyovasküler sisteminin ROT kaynaklarından biri olan NADPH oksidaz enziminin kardiyak hipertrofi durumunda protein ekspresyonu değerlendirildi ve EA'nın bu sürece etkisi incelendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.9'da özetlendi. İlk olarak NADPH oksidaz enzim ailesinin katalitik ünitesi olan Nox2'nin protein ekspresyonu değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Kontrol:  $1,05 \pm 0,05$ ; İSO:  $1,10 \pm 0,07$ ; İSO+EA:  $1,01 \pm 0,06$ ; K+EA:  $0,96 \pm 0,03$ ,  $p=0,33$ ). Daha sonra NADPH oksidaz enziminin aktif hale gelmesi için gerekli olan hücre içindeki alt birimleri incelendi. p-47phox protein ekspresyonu değerlendirildiğinde; İSO grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı bulundu (Kontrol:  $0,69 \pm 0,06$ ; İSO  $1,02 \pm 0,06$ ,  $p<0,001$ ). İSO+EA grubunda ekspresyon seviyesinde azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir düzelme görülmedi (İSO:  $1,02 \pm 0,06$ ; İSO+EA:  $0,84 \pm 0,05$ ,  $p=0,11$ ). Bununla birlikte Kontrol ve K+EA grupları arasında da anlamlı bir fark bulunmadı (Kontrol:  $0,69 \pm 0,06$ ; K+EA:  $0,69 \pm 0,06$ ,  $p=1,00$ ). Buna karşılık, p-22phox protein ekspresyonunun İSO grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı (Kontrol:  $0,60 \pm 0,04$ ; İSO:  $0,90 \pm 0,03$ ,  $p<0,001$ ), EA uygulamasının ise protein ekspresyonundaki bu artışı önemli düzeyde baskıladığı tespit edildi (İSO:  $0,90 \pm 0,03$ ; İSO+EA:  $0,74 \pm 0,04$ ,  $p<0,03$ ). p-22phox protein ekspresyonu bakımından Kontrol ve K+EA grupları arasında ise anlamlı bir fark bulunmadı (Kontrol:  $0,60 \pm 0,04$ ; K+EA:  $0,63 \pm 0,04$ ,  $p=0,95$ ) (Şekil 4.9A-C).

Çalışmamızda ayrıca miyokardiyal büyüme sırasında gerçekleşen fonksiyonel bozukluğa protein oksidasyonunun katkısı araştırıldı. Bu durum için her grubun protein karbonil sevipleri ölçüldü. Protein oksidasyonunun İSO grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı (Kontrol:  $0,32 \pm 0,06$  nmol/mg; İSO:  $1,68 \pm 0,25$  nmol/mg,  $p<0,001$ ) gözlenirken İSO+EA grubunda İSO grubuna göre protein oksidasyonunun anlamlı derecede azaldığı (İSO:  $1,68 \pm 0,25$  nmol/mg; İSO+EA:  $0,66 \pm 0,09$  nmol/mg,  $p<0,001$ ) görüldü. Protein oksidasyonu bakımından K+EA grubu ile Kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Kontrol:  $0,32 \pm 0,06$  nmol/mg; K+EA:  $0,60 \pm 0,09$  nmol/mg,  $p=0,56$ ). Bu bulgular EA uygulamasının İSO sonucunda oluşan kardiyak hipertrofiye antioksidan özellik gösterdiğini kanıtlamaktadır. Sonuçlar bar grafiği olarak Şekil 4.9D'de verildi.



**Şekil 4. 9.** Deney grupların oksidatif stress parametreleri. A) Nox2 (60 kDa), B) p-47phox (47 kDa), C) p-22phox (22 kDa) protein ekspresyon miktarları ve western blot görüntüleri. D) Protein karbonil seviyeleri. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi. Her protein ekspresyonu GAPDH ile normalize edildi. Protein ekspresyon miktarları için tüm gruplarda n=8, protein karbonil ölçümleri için sırasıyla Kontrol, İSO, İSO+EA, K+EA gruplarında n=5, 3, 4, 5, Kontrol grubundan fark \*p<0,001, İSO grubundan fark #p<0,001.

## 5. TARTIŞMA

Kardiyovasküler hastalıklar bilim ve teknolojideki tüm ilerlemelere rağmen dünya çapında morbiditenin ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biridir. Bu nedenle kardiyovasküler hastalıklara neden olabilecek patolojik kaynakların belirlenmesi ve bunlara yönelik tedavilerin geliştirilmesi günümüzde hala önemini korumaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar arasında yer alan patolojik kardiyak hipertrofi tedavi edilmediğinde ve önlenmediğinde kalp yetmezliğine yol açabilmektedir. Patolojik kardiyak hipertrofi aşırı nörohormonal ve mekanik uyarıların artmasıyla gelişir. Bu uyarıların etkilediği sinyal mekanizmalarının en önemlilerinden birisi  $\beta$ -adrenerjik sinyal yolağıdır.  $\beta$ -adrenerjik sinyal yolağı kalbin birçok fizyolojik ve patolojik yanıtlarına aracılık etmektedir.  $\beta$ -AR'ların akut olarak uyarılması kalbin kasılma kuvvetini ve atım hızını arttırarak kalp debisinde belirgin bir artışa neden olmaktadır. Ayrıca,  $\beta$ -AR'ların kronik olarak uyarılması sonucunda aktive olan sinyal yolağı, patolojik kardiyak hipertrofiye ve ilerleyen dönemlerde kalp yetmezliğine yol açabilmektedir. Sürekli  $\beta$ -AR aktivasyonunun farelerde, domuzlarda ve tavşanlarda kardiyak hipertrofiye neden olduğu deneysel koşullarda gösterilmiştir (Hohimer ve ark., 2005; Kim ve ark., 2006). Bunun yanında, köpekler üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada doğal bir  $\beta$ -AR agonisti olan noradrenalinin kronik olarak uygulaması sonucunda sol ventrikül ağırlığında artış meydana geldiği gösterilmiştir (Stewart ve ark., 1992).

Deneysel olarak patolojik kardiyak hipertrofi modelini oluşturabilmek için bir  $\beta$ -AR agonisti olan İSO uygulanmaktadır. İSO'nun kardiyak hipertrofiye yol açtığını gösteren ilk bulgular miyokard nekrozu için gerçekleştirilen deneysel model çalışmalarından elde edilmiştir (Chappel ve ark., 1959; Handforth, 1962; Ostadal ve ark., 1968). Bu çalışmalarda deney hayvanlarına 1-3 gün boyunca yüksek dozlarda İSO uygulanması sonucunda insanlardaki miyokardiyal enfarktüse benzer nekrozu indüklediği gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda sıçanlara uzun süreli düşük doz İSO uygulamasının insanlardakine benzer konjestif kalp yetmezliğine yol açtığı gösterilmiştir (Osadchii, 2007; Nichtova ve ark., 2012). Ayrıca, birçok çalışmada düşük dozlarda İSO uygulamasıyla kardiyak hipertrofinin oluştuğu belirlenmiştir (Benjamin ve ark., 1989).



Çalışmamızda, bir  $\beta$ -AR agonisti olan İSO'nun dört hafta boyunca kronik olarak uygulanmasının ardından oluşan kardiyak hipertrofi modelinde kardiyomiyositlerde meydana gelen  $Ca^{2+}$  regülasyonundaki değişiklikler ve kasılma bozuklukları belirlendi.  $\beta$ -AR agonistinin sürekli uyarılması sonucunda artan ROT miktarının  $Ca^{2+}$  regülasyonundaki değişikliklere etkisi ortaya kondu. Ayrıca, bir antioksidan olan EA uygulamasının kardiyak hipertrofi durumunda değişen  $Ca^{2+}$  regülasyonuna ve hücrelerin kontraktil aktivitesine etkisi incelendi. Böylelikle, EA'nın kardiyoprotektif özellikleri kapsamlı şekilde araştırıldı.

Çalışmamızda, gruplar arasında sağkalım oranları açısından farklılıklar olduğu bulundu. Kontrol ve K+EA gruplarında ölüm olayı görülmezken, İSO uygulanan grupta ise sağkalım oranının %35,41'e düştüğü görüldü. Bulgularımızla benzer şekilde, Meszaros ve Levai (1990) ile Mikusova ve ark. (2009) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda uzun süreli düşük doz İSO (5 mg/kg/gün, 21 gün) uygulamasının ardından ölüm oranının %80-90'a kadar arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, Yeh ve ark. (2010) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada İSO (5 mg/kg/gün, 10 gün) uygulanan grupta sağkalımın %60 olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, İSO+EA grubunda sağkalım oranı belirgin şekilde artarak %58,62 olarak gerçekleşti. Bu nedenle, çalışma bulgularımız göstermektedir ki EA uygulaması kalp krizi ve miyokardiyal yetersizlikten dolayı meydana gelen ölüm oranında azalmaya neden olmaktadır. Elde ettiğimiz bulguyla uyumlu olarak, Kannan ve Quine (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada EA uygulamasının miyokardiyal enfaktüs alanını azalttığı, apoptotik gen ekspresyonlarını düzenlediği, hücre canlılığını arttırdığı ve böylece miyokardiyumu İSO ile indüklenen miyokard enfarktüsüne karşı koruduğu belirlenmiştir.

Kardiyovasküler sistemdeki değişiklikler nedeniyle kalp üzerinde artan talepler sürekli  $\beta$ -AR uyarımına neden olur ve bunun sonucunda kardiyak hipertrofinin göstergesi olan kalp ağırlığı/vücut ağırlığı oranı, kalp ağırlığı/tibia uzunluğu oranında önemli bir artış meydana gelir (Linck ve ark., 1998; Suzuki ve ark., 1998; Ozaki ve ark., 2002; Ferreira ve ark., 2007; Mikusova ve ark., 2009). Çalışmamızda, İSO grubunda kalp ağırlığı/vücut ağırlığı ve kalp ağırlığı/tibia uzunluğu oranlarının arttığı görüldü. Benzer şekilde, Ryu ve ark. (2016), Saleem ve ark. (2018) ve Gan ve ark. (2019) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda da kalp ağırlığı/vücut ağırlığı ve kalp

ağırlığı/tibia uzunluğu oranlarının İSO uygulanan grupta arttığı ve kardiyak hipertrofinin gerçekleştiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, çalışmamızda, İSO uygulanan grupta kalp ağırlığı/vücut ağırlığı ve kalp ağırlığı/tibia uzunluğu oranlarındaki bu artışların EA uygulamasıyla azaldığı görüldü.

Kardiyak hipertrofinin göstergesi olan diğer parametreler ise hücre boyutunda ve fetal kardiyak genlerin aktivasyonundaki artışlardır (Selvetella ve Lembo, 2005; Shimizu ve Minamino, 2016). Çalışmamızda, İSO uygulanan grupta hücre büyüklüğünü temsil eden hücre kapasitanslarının arttığı görüldü. EA uygulamasının ise hücresel boyutta dikkat çekici bir düzelmeye neden olduğu, ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı bir değere ulaşmadığı belirlendi. Bununla birlikte, İSO grubunda fetal kardiyak genlerden biri olan ANP'nin protein ekspresyonunun arttığı bulundu. Benzer şekilde, Ryu ve ark. (2016) ve Wang ve ark. (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda İSO uygulamasının ANP protein ekspresyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda, İSO grubunda meydana gelen ANP protein ekspresyonundaki bu artışın EA uygulamasıyla azaldığı görüldü. Böylece, morfolojik ve moleküler olarak İSO uygulanan sıçanlarda kardiyak hipertrofinin geliştiği ve EA uygulamasının kardiyak hipertrofiyi önlediği belirlendi.

Çalışmamızda,  $\beta$ -AR sinyal yolağının kronik uyarılması sonucunda oluşan kardiyak hipertrofinin yol açabileceği fonksiyonel değişiklikleri ve EA'nın bu duruma karşı etkisini araştırmak için kardiyomiyositlerin kasılma parametreleri incelendi. İSO uygulanan grupta sarkomerlerin fraksiyonel kısalma miktarında azalma ve kasılma-gevşeme kinetiklerinde yavaşlama olduğu görüldü. Böylece, İSO uygulaması ile oluşturulan kardiyak hipertrofinin kalbin fonksiyonel yanıtlarını önemli ölçüde bozduğu belirlendi. İlgili literatür incelendiğinde; çalışma bulgularımızın Cai ve ark. (2015), Gong ve ark. (2016) ve Reboul ve ark. (2017) çalışmalarından elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür. Ancak Curl ve ark. (2018) tarafından gerçekleştirilen çalışmada kasılma parametrelerinin kontrole göre arttığı belirlenmiştir. Bunun nedeni büyük olasılıkla kardiyak hipertrofi sürecinin başlangıç evrelerinde kardiyak debiyi korumak için kalbin kasılma fonksiyonunu arttırmasıdır. Ancak bu süreç devam ettikçe kalp artan talebi karşılayamaz hale gelir ve dekompanse hipertrofi gerçekleşir. Bunun sonucunda kalp fonksiyonunda bozulma meydana gelir. Buradan hareketle, çalışmamızda oluşturulan kardiyak hipertrofi modelinin dekompanse olduğu sonucuna varılabilir. Ayrıca, çalışmamızda kardiyak hipertrofi

sonucunda oluşan kasılma parametrelerindeki değişikliklerin EA uygulaması tarafından düzeltildiği görülmektedir. Bu bulgular ışığında, bir antioksidan olan EA uygulamasının  $\beta$ -AR kronik uyarılmasının neden olduğu fonksiyonel bozuklukları önleyebileceği veya geri çevirebileceği söylenebilir.

Kalbin kasılması ve gevşemesi hücre içindeki  $Ca^{2+}$  iyonları tarafından gerçekleştirilir. Hücre içi  $Ca^{2+}$  homeostazı kalp fonksiyonu için kritik öneme sahiptir (Bers, 2002). Bu nedenle, kardiyak hipertrofi durumunda değişen kasılma parametrelerinin sorumlusu hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonlarındaki anormallikler olabilir. Bu nedenle, çalışmamızda geçici hücre içi  $Ca^{2+}$  miktarları ölçülmüştür. Dinlenme durumunda ölçülen bazal hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyon seviyelerinin İSO grubunda arttığı gözlemlendi. Benzer şekilde, Beuckelmann ve ark. (1992) insan ventrikül miyositleri üzerinde yaptıkları çalışmada ileri patolojik kardiyak hipertrofiye sahip olan grupta dinlenme durumunda bazal  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunda artış gözlemlenmiştir. Çalışmamızda, EA uygulamasının diyastolik hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunu azalttığı bulundu. Bulgularımız, kardiyak hipertrofi koşullarında, dinlenme durumunda hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunda artış olduğunu ve artmış olan hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun EA uygulaması ile düştüğünü göstermektedir. Ayrıca, çalışmamızda sistol sırasında  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun nasıl değiştiği incelendi ve İSO uygulanan grupta  $Ca^{2+}$  transient genliklerinin düştüğü, tepeye çıkış ve iniş sürelerinin uzadığı görüldü. Bulgularımızla uyumlu olarak, birçok çalışmada hastalık durumunda  $Ca^{2+}$  transient genliğinin ve kinetiğinin yavaşladığı (Jiang ve ark., 2002; Ai ve ark., 2005; Kubalova ve ark., 2005; Gavioli ve ark., 2014; Reboul ve ark., 2017), bununla birlikte, EA uygulamasının hem genlikteki azalmayı hem de iniş hızlarındaki yavaşlamayı düzelttiği tespit edilmiştir.

Kasılma sırasında hücre içindeki  $Ca^{2+}$  miktarını belirleyen en önemli faktörlerden birisi L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalından giren  $Ca^{2+}$  miktarıdır. L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalından giren  $Ca^{2+}$  miktarının fazla olması durumunda SR üzerinde bulunan çok sayıdaki RyR reseptörlerini uyarır ve sitozole daha fazla miktarda  $Ca^{2+}$  salınmasına neden olur. Kasılmanın kuvvetli olabilmesi için SR'dan RyR aracılı salınan  $Ca^{2+}$  miktarı önemlidir. Çünkü, salınan  $Ca^{2+}$  miktarındaki artış  $Ca^{2+}$  transientlerinin genliğinde artışa ve tepeye ulaşma süresinde azalmaya neden olur (Bodi ve ark., 2005). Bu nedenle, çalışmamızda L-tipi  $Ca^{2+}$  akımları incelenerek kardiyak hipertrofi durumunda  $Ca^{2+}$  transientlerindeki değişikliklerle ilişkili olup olmadığı ve EA uygulamasının bu

parametreler üzerindeki etkilerinin kaynağı araştırıldı. Patolojik hipertrofi modelinde  $Ca^{2+}$  akımının azaldığını gösteren daha önceki çalışmalarla benzer şekilde bizim çalışmamızda da İSO uygulanan grupta  $Ca^{2+}$  akımının azaldığı görüldü (Mukherjee ve ark., 1998; Treinys ve Jurevicius, 2008). Ancak, Beuckelmann ve ark. (1992) ileri kalp yetmezliğine sahip hastaların ventrikül miyositleri üzerinde yaptıkları çalışmada ve Gomez ve ark. (1997) yüksek kan basıncı sonucunda patolojik kardiyak hipertrofi oluşturdukları sıçanların ventrikül miyositleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda kardiyak hipertrofi durumunda  $Ca^{2+}$  akımının değişmediğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda, EA uygulamasının kardiyak hipertrofi durumunda azalan  $Ca^{2+}$  akımını arttırdığı görüldü. Bu nedenle, kardiyak hipertrofi durumunda sistol sırasında SR'dan salınan  $Ca^{2+}$  miktarının az olmasının nedenlerinden biri L-tipi  $Ca^{2+}$  kanalından giren  $Ca^{2+}$  miktarının az olması olabilir. Çünkü hücre içine giren  $Ca^{2+}$  miktarının az olması SR üzerinde daha az sayıda RyR'nin açılmasını tetikleyecek ve böylece SR'dan az miktarda  $Ca^{2+}$  salınmasına neden olacaktır. Böylece, kardiyak hipertrofi durumunda  $Ca^{2+}$  transient genliğinin düşük olmasının nedenlerinden birinin  $Ca^{2+}$  indüklü  $Ca^{2+}$  salımında rol oynayan  $Ca^{2+}$  akımındaki azalmanın olduğu anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, EA uygulaması  $Ca^{2+}$  akımını arttırarak SR'dan salınan  $Ca^{2+}$  miktarını arttırmakta ve kasılma fonksiyonunu düzeltebilmektedir. Ayrıca, kardiyak hipertrofi durumunda SR'dan salınan  $Ca^{2+}$  miktarının az olması ve diyastolik  $Ca^{2+}$  miktarının fazla olması, dinlenme durumunda RyR aracılığıyla hücre içerisine  $Ca^{2+}$  sızıntısının artmış olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, EA uygulamasının diyastolik  $Ca^{2+}$  miktarını ve  $Ca^{2+}$  transient genliğini iyileştirmesi, dinlenme sırasındaki RyR  $Ca^{2+}$  sızıntısını azaltmış olabileceğini düşündürmektedir.

Uyarılma-kasılma çiftleniminin  $Ca^{2+}$  döngüsünü belirleyen en önemli faktörlerden biri SR'daki  $Ca^{2+}$  miktarıdır. Kalp yetmezliği durumunda SR  $Ca^{2+}$  miktarının azaldığı ve bu azalma kasılmada bozulmaya neden olabilmektedir. Çalışmamızda, SR'daki  $Ca^{2+}$  miktarının İSO grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı bulundu. Böylece SR  $Ca^{2+}$  miktarının azalmasının kasılma kuvvetindeki yavaşlamanın nedenlerinden biri olabileceği düşünülmektedir. Ancak, İSO+EA grubunda SR'da depolanan  $Ca^{2+}$  miktarındaki azalmanın anlamlı düzeyde değişmediği. Bu durumda kasılma kuvvetindeki düzelme üzerinde etkisi olmadığı düşünülmektedir.

Kardiyak hipertrofi durumunda  $Ca^{2+}$  transientlerinin uzaması, gevşeme sırasında sitozolik  $Ca^{2+}$ 'un uzaklaştırılmasında görev alan düzenleyici proteinlerdeki

anormalliklerden kaynaklanabilir. SERCA aktivitesindeki azalma bu durumun ana nedenlerinden biri olarak gösterilmektedir (Fragoso ve Zarain-Herzberg, 2014). Çünkü fizyolojik durumda gevşeme esnasında SERCA hücre içerisindeki  $Ca^{2+}$ 'un %70'ini SR içerisine geri alarak uzaklaştırmaktadır. Kardiyak hipertrofi durumunda SERCA aktivitesindeki azalmasının nedeni ya SERCA'nın kendi ekspresyonundaki ya da aktivitesini düzenleyen PLB'nin ekspresyonundaki değişimden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda bu süreçten sorumlu olan proteinlerin ekspresyonları incelendi. İSO ile oluşturulan kardiyak hipertrofi grubunda SERCA protein ekspresyonunun arttığı, PLB protein miktarının değişmediği ve p-PLB miktarının ise arttığı gözlemlendi. Ancak, gerçekleştirilen birçok çalışma kalp yetmezliği durumlarında SERCA ekspresyonunun azaldığını veya değişmediğini göstermektedir (Currie ve Smith, 1999; Schwinger ve ark., 1999; Jiang ve ark., 2002). Yapılan birçok çalışmada SERCA aktivitesinin sadece PLB tarafından değil aynı zamanda sarkolipin tarafından da düzenlendiği bulunmuştur (Vangheluwe ve ark., 2006; Bhupathy ve ark., 2007; Shanmugam ve ark., 2011). Bununla birlikte, sarkolipin de PLB gibi fosforile olmadığı durumlarda SERCA'yı inhibe etmektedir. Babu ve ark. (2006) tarafından gerçekleştirilen çalışmada sarkolipinin ekspresyon düzeyindeki aşırı artışın SERCA aktivitesini inhibe ettiği, böylece, SR'a  $Ca^{2+}$  geri alımında ve  $Ca^{2+}$  transient genliğinde azalmaya ve gevşeme hızında yavaşlamaya neden olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, aynı çalışmada, sarkolipin seviyelerindeki artışın PLB'nin fosforilasyon durumunu değiştirmedeği ve SERCA pompası üzerindeki sarkolipin etkisinin doğrudan olduğu öne sürülmektedir. Asahi ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada kardiyak hipertrofi durumunda sarkolipinin ekspresyon düzeyinin arttığı, bunun sonucunda SERCA'nın  $Ca^{2+}$  afinitesinin ve  $Ca^{2+}$  transient genliğinin azaldığı, ayrıca, gevşemenin yavaşladığı bulunmuştur. Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre, kardiyak hipertrofi durumunda SERCA ve p-PLB ekspresyon düzeylerindeki artışın diyastol sırasında artan hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunu azaltmaya yönelik bir telafi mekanizması olarak gerçekleştiği söylenebilir. Ancak kardiyak hipertrofi durumunda sarkolipin ekspresyon düzeyindeki artış SERCA aktivitesini azaltmış neden olabilir. Böylece çalışmamızdaki bulgulardan yola çıkarak kardiyak hipertrofi durumunda  $Ca^{2+}$  transientlerinin iniş sürelerindeki uzamanın sarkolipin ekspresyon seviyelerindeki artıştan kaynaklanabileceği söylenebilir. Bununla birlikte, çalışmamızda, EA uygulamasıyla artan SERCA ekspresyonunun değişmediği, p-PLB miktarının azaldığı ve PLB ekspresyonunun değişmediği

gözlemlendi. Namekata ve ark. (2013) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, EA'nın bir SERCA aktivatörü olduğu ve SERCA aktivitesini artırarak diyastolik disfonksiyonu düzeltebileceği öne sürülmüştür. Bununla birlikte, çalışmamızda, kardiyak hipertrofi sığınara EA uygulaması sonucunda  $Ca^{2+}$  transient iniş sürelerinin azaldığı, bunun nedeninin ise EA'nın doğrudan SERCA aktivitesini artırmasından kaynaklanabileceği sonucuna varılabilir.

Protein kinazlardan biri olan CaMKII, uyarılma-kasılma çiftleniminde rol oynayan birçok iyon kanalını ve  $Ca^{2+}$  taşıyıcı proteinleri fosforile edebilmektedir. Bu nedenle, CaMKII'nin ekspresyon miktarındaki değişiklikler kasılma fonksiyonundaki bozukluklara katkıda bulunabilir (Bers ve Grandi, 2009; Anderson ve ark., 2011). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda kardiyak hipertrofi ve kalp yetmezliği durumunda CaMKII aktivitesinin arttığı ve CaMKII ekspresyonundaki aşırı artışın kardiyak hipertrofiye ve kalp yetmezliğine neden olduğu gösterilmiştir (Ai ve ark., 2005; Sossalla ve ark., 2010; Swaminathan ve ark., 2012). Bununla birlikte, CaMKII inhibisyonunun kronik  $\beta$ -AR aktivasyonu engelediği ve böylece kardiyak hipertrofiyi ve kardiyak fonksiyon bozukluğunu düzelttiği belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2005; Sag ve ark., 2009). Kardiyak hipertrofi durumunda CaMKII aktivitesinin ve ekspresyonunun aşırı artışının diyastol sırasında RyR fosforilasyonunda artışa ve diyastolik SR  $Ca^{2+}$  sızıntısına neden olduğu gösterilmiştir (Camors ve Valdivia, 2014; Mattiazzi ve ark., 2015). Böylece, CaMKII ekspresyonunun ve aktivitesinin aşırı artışı dinlenme sırasında hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun yükselmesine ve SR yükünün azalmasına neden olmaktadır (Maier ve ark., 2003; Currie ve ark., 2004; Camors ve Valdivia, 2014). Çalışmamızda, daha önce gerçekleştirilen çalışma sonuçları ile uyumlu olarak, İSO uygulamasıyla oluşturulan kardiyak hipertrofi grubunda hem CaMKII hem de p-CaMKII ekspresyonunun arttığı görüldü. EA uygulamasının, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte hem CaMKII hem de p-CaMKII ekspresyonunu azalttığı bulundu. Böylece, kardiyak hipertrofi durumunda elde edilen elektrofizyolojik bulgularla birlikte CaMKII ekspresyonundaki artış değerlendirildiğinde, İSO uygulamasının dinlenme durumunda RyR'yi fosforile ederek SR  $Ca^{2+}$  sızıntısına ve dinlenme sırasındaki sitozolik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunda artışa neden olduğu söylenebilir. Ayrıca, EA uygulaması CaMKII ekspresyonunun azalması yönünde etki ederek dinlenme sırasında hücre içerisine  $Ca^{2+}$  sızıntısının

azalmasına ve böylece dinlenme sırasında hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun azalmasına neden olmaktadır.

Kalpte ROT üretiminin önemli kaynaklarından biri olan NADPH oksidaz enzim ailesi birçok sinyal yolağının uyarılmasıyla aktive olur ve bunlardan bir tanesi de  $\beta$ -AR sinyal yolağıdır (Nabeebaccus ve ark., 2011; Sag ve ark., 2014). Kardiyak hipertrofinin gelişimine katkıda bulunan  $\beta$ -AR'ın katekoleminlerle uzun süreli uyarılması ROT üretiminin artmasına neden olur (Bovo ve ark., 2012). Son yıllarda yapılan çalışmalarda NADPH oksidaz türevli ROT'ların kardiyak hipertrofinin oluşmasında önemli bir rol oynadığı ve bu süreçte aktivitesinin ve ekspresyonunun arttığı görülmüştür (Heymes ve ark., 2003; Looi ve ark., 2008). Çalışmamızda,  $\beta$ -AR sinyal yolağının sürekli uyarılması sonucunda NADPH oksidaz enzim aracılı ROT üretiminin gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için NADPH oksidaz enziminin Nox2 izoformunun ve aktivasyonunda gerekli olan alt birimlerinin (p-22phox ve p-47phox) ekspresyonları incelendi. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre İSO uygulamasının Nox2 protein ekspresyonunu değiştirmediği ancak p-22phox ve p-47phox alt birimlerinin protein ekspresyonlarını arttırdiği görüldü. Literatürde gerçekleştirilen birçok çalışmada kardiyak hipertrofi ve kalp yetmezliği durumunda Nox2 izoformunun ve alt birimleri olan p-22phox ve p-47phox protein ekspresyonlarının arttığı bulunmuştur (Li ve ark., 2002; Krijnen ve ark., 2003; Murdoch ve ark., 2006; Jin ve ark., 2017). Çalışma bulgularımızla uyumlu olarak, Polizio ve ark. (2008) yapmış oldukları çalışmada kardiyak hipertrofi durumunda Nox2 ekspresyonunun değişmediğini, bununla birlikte, p-22phox ve p-47phox alt birimlerinin protein ekspresyonlarının arttığını göstermişlerdir. Ayrıca, fareler üzerinde yapılan birçok çalışmada p-47phox protein ekspresyonunun kalp yetmezliği durumunda arttığı, p-47phox nakavt farelerde kalp yetmezliğinin gelişmediği görülmüştür (Ahn ve ark., 2015). Bunun dışında, gerçekleştirilen bazı çalışmalarda p-47phox protein ekspresyonu olmadığı durumlarda ROT üretiminin azaldığı gösterilmiştir (Doerries ve ark., 2007; Patel ve ark., 2013; Ahn ve ark., 2015). Çalışmamızda kardiyak hipertrofi durumunda EA uygulamasının p-47phox protein ekspresyonunda anlamlı seviyeye ulaşmasa da bir azalmaya neden olduğu, bununla birlikte, p-22phox protein ekspresyonlarındaki azalmanın ise daha belirgin olduğu görüldü. Böylece, çalışma bulgularımızdan hareketle, kronik İSO uygulamasıyla NADPH oksidaz enzim aracılı ROT üretiminin arttığı ve EA uygulamasıyla bu

durumun düzeldiği söylenebilir. Bununla birlikte, kardiyak hipertrofi ve kalp yetmezliği durumunda NADPH oksidaz enzimi tarafından artan ROT miktarının uyarılma-kasılma çiftlenimini etkilediği bilinmektedir (Santos ve ark., 2016). Ayrıca, ROT'ların hücre içerisindeki aşırı artışının CaMKII aktivitesinin artışına neden olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2005). ROT'lar hem kinazlar hem de kanala direkt oksidasyon yoluyla etki ederek diyastolik  $Ca^{2+}$  sızıntısını arttırabilir ve SR  $Ca^{2+}$  içeriğinin azalmasına neden olabilir (Burgoyne ve ark., 2012). Çalışma bulgularımız, kardiyak hipertrofide artan NADPH oksidaz enzim aracılı ROT'ların, CaMKII protein ekspresyonunu arttırdığını ve böylece diyastolik  $Ca^{2+}$  sızıntısını arttırarak dinlenimde hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunda artışa neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca, EA uygulamasının ROT miktarında azalmaya neden olarak bu durumu tersine çevirdiği görülmektedir.

Kardiyak hipertrofi durumunda hücre içerisinde artan ROT miktarı arjinin, histidin, prolin, treonin ve sistein gibi birçok aminoasit rezidülerinde protein karbonillerin oluşmasına neden olmakta ve bu nedenle, protein oksidatif hasarı gerçekleşmektedir (Stadtman ve Levine, 2003). Birçok çalışmada protein oksidasyonunun ve oksidatif stresin zararlı etkilerini değerlendirmek için protein karbonilasyonu kullanılmaktadır (Yan ve Sohal, 2000; Dalle-Donne ve ark., 2003; Wehr ve Levine, 2013). Bu nedenle protein karbonil, protein oksidasyonunu ve oksidatif stresin derecesini ölçmek için en yaygın kullanılan biyobelirteçlerden biridir (Stadtman, 2001). Çalışmamızda, oluşan ROT'un ciddiyetini belirlemek için protein karbonil miktarları ölçüldü. İSO uygulaması sonucunda oluşan kardiyak hipertrofi durumunda protein oksidasyonunun arttığı, EA uygulamasıyla bu artışın azaldığı görüldü. Benzer şekilde, Bowen ve ark. (2015) tarafından gerçekleştirilen çalışmada kalp yetmezliği oluşturulan farelerde protein karbonil miktarının arttığı ve bu artışın kasılma fonksiyonunda bozukluğa neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, çalışma bulgularımızdan hareketle, kardiyak hipertrofi durumunda zayıflayan kasılmanın uyarılma-kasılma çiftleniminden sorumlu proteinlerin oksidasyonlarından kaynaklanabileceği ve EA uygulamanın antioksidan özelliğinden dolayı bu kasılma fonksiyonunu düzeltebileceği söylenebilir.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda,  $\beta$ -AR agonisti olan İSO'nun uygulanması sonucunda oluşan kardiyak hipertrofinin miyositlerin kasılmasında ve  $Ca^{2+}$  regülasyonunda meydana getirdiği değişiklikler ve bu değişikliklere 4 hafta boyunca EA uygulamasının etkisi incelendi.

Sıçanlarda İSO (0,5 mg/kg/gün) uygulamasının sağkalım oranını azalttığı, buna karşın EA (20 mg/kg/gün) uygulamasının sağkalımı arttırdığı görüldü. Böylece, EA uygulamasının kalp krizi ve miyokardiyal yetersizlikten dolayı meydana gelen ölüm oranında azalma sağlayabileceği gösterildi.

4 hafta süresince İSO uygulamasının ardından sıçanlarda patolojik kardiyak hipertrofi geliştiği ve EA uygulamasının bu durumu engellediği görüldü.

Patolojik kardiyak hipertrofi sonucunda meydana gelen kasılma genliğindeki azalmanın ve gevşeme süresindeki uzamanın EA uygulamasıyla düzeldiği bulundu. Ayrıca, bozulan hücre içi  $Ca^{2+}$  regülasyonunun EA uygulamasıyla düzeldiği gözlemlendi.

Sistolü başlatan  $Ca^{2+}$  akımı ölçüldüğünde patolojik kardiyak hipertrofi durumunda  $Ca^{2+}$  akımının azaldığı ve EA uygulamasıyla baskılanmış olan akımın arttığı bulundu. Bu durum, EA uygulamasıyla düzelen  $Ca^{2+}$  transient genliğindeki artışı açıklamaktadır.

Kardiyak hipertrofi durumunda diyastolik hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun arttığı, buna karşın EA uygulamasıyla normal seviyelere yaklaştığı bulundu. Bu durumun ana kaynaklarından biri dinlenim sırasında RyR fosforilasyondaki artış sonucunda artan diastolik  $Ca^{2+}$  sızıntısı olabilir. RyR fosforilasyonunu sağlayan kinazlardan biri de CaMKII proteindir. CaMKII'nin protein ekspresyonları değerlendirildiğinde kardiyak hipertrofi durumunda arttığı, ancak EA uygulamasıyla azaldığı bulundu.

Kronik  $\beta$ -AR uyarılması sonucunda NADPH oksidaz enzim izoformu olan Nox2 ve alt birimlerinin (p-22phox ve p-47phox) ekspresyon düzeylerinin artmasından dolayı ROT miktarının arttığı, bununla birlikte, EA uygulamasıyla ROT miktarının azaldığı bulundu. Kardiyak hipertrofi durumunda hücre içerisinde artan ROT miktarının CaMKII fosforilasyonunu arttırabileceğini düşünülmektedir.

Kardiyak hipertrofi durumunda  $Ca^{2+}$  transient iniş sürelerinin uzamasının SERCA aktivitesindeki azalmadan ve bunun da sarkolipin ekspresyon düzeyindeki artıştan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, EA'nın doğrudan SERCA aktivitesini arttırarak  $Ca^{2+}$  transientlerinin iniş sürelerinde azalmaya neden olduğu söylenebilir.

Sonuç olarak, kardiyak hipertrofi durumunda artan ROT'ların  $Ca^{2+}$  regülasyonunun bozulmasına yol açarak miyositlerin kontraktıl aktivitesinde anormalliklere neden olabileceği ve kronik EA uygulamasıyla  $Ca^{2+}$  regülasyonunun düzelmesine bağlı olarak fonksiyonel yanıtların da iyileşebileceği görülmektedir.

Kardiyak hipertrofi durumunda bozulan  $Ca^{2+}$  homeostazisinin EA uygulamasıyla düzeldiği, ancak, bu düzelmeyin hangi mekanizmalar aracılığı ile gerçekleştiğini kesin olarak belirlemek ve miyosit dışındaki diğer yapıların da bu süreçlerdeki rollerini tayin etmek için daha kapsamlı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

Abiria SA, Colbran RJ. CaMKII associates with Cav1.2 L-type calcium channels via selected  $\beta$  subunits to enhance regulatory phosphorylation. *J Neurochem.* 2010;112: 150-161.

Ahn B, Beharry AW, Frye GS, Judge AR, Ferreira LF. NAD(P)H oxidase subunit p47phox is elevated, and p47phox knockout prevents diaphragm contractile dysfunction in heart failure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;309: 497-505.

Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM.  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  leak in heart failure. *Circ Res.* 2005;97: 1314-1322.

Aiyer HS, Srinivasan C, Gupta RC. Dietary berries and ellagic acid diminish estrogen-mediated mammary tumorigenesis in ACI rats. *Nutr Cancer.* 2008;60: 227-234.

Anderson ME, Brown JH, Bers DM. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51: 468-473.

Asahi M, Otsu K, Nakayama H, Hikoso S, Takeda T, Gramolini AO, Trivieri MG, Oudit GY, Morita T, Kusakari Y, Hirano S, Hongo K, Hirotsu S, Yamaguchi O, Peterson A, Backx PH, Kurihara S, Hori M, MacLennan DH. Cardiac-specific overexpression of sarcolipin inhibits sarco(endo)plasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase (SERCA2a) activity and impairs cardiac function in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101: 9199-9204.

Babu GJ, Bhupathy P, Petrashevskaya NN, Wang H, Raman S, Wheeler D, Jagatheesan G, Wiczorek D, Schwartz A, Janssen PM, Ziolo MT, Periasamy M. Targeted overexpression of sarcolipin in the mouse heart decreases sarcoplasmic reticulum calcium transport and cardiac contractility. *J Biol Chem.* 2006;281: 3972-3979.

Baker AJ. Adrenergic signaling in heart failure: a balance of toxic and protective effects. *Pflugers Arch.* 2014;466: 1139-1150.

Balakumar P, Jagadeesh G. Multifarious molecular signaling cascades of cardiac hypertrophy: can the muddy waters be cleared? *Pharmacol Res.* 2010;62: 365-383.

Barch DH, Rundhaugen LM, Stoner GD, Pillay NS, Rosche WA. Structure-function relationships of the dietary anticarcinogen ellagic acid. *Carcinogenesis.* 1996;17: 265-269.

Barros Rde A, Okoshi MP, Cicogna AC. Beta-adrenergic pathway in healthy and hypertrophied hearts. *Arq Bras Cardiol.* 1999;72: 641-656.

Bartos DC, Grandi E, Ripplinger CM. Ion channels in the heart. *Compr Physiol.* 2015;5: 1423-1464.

Benjamin IJ, Jalil JE, Tan LB, Cho K, Weber KT, Clark WA. Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circ Res.* 1989;65: 657-670.

Berkban T, Boonprom P, Bunbupha S, Welbat JU, Kukongviriyapan U, Kukongviriyapan V, Pakdeechote P, Prachaney P. Ellagic acid prevents L-NAME-induced hypertension via restoration of eNOS and p47phox expression in rats. *Nutrients*. 2015;7: 5265-5280.

Bernardo B, Weeks K, Pretorius L, McMullen J. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*. 2010;128: 191-227.

Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415: 198-205.

Bers DM. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37: 417-429.

Bers DM, Grandi E. Calcium/calmodulin-dependent kinase II regulation of cardiac ion channels. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009;54: 180-187.

Bers DM, Perez-Reyes E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res*. 1999;42: 339-360.

Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation*. 1992;85: 1046-1055.

Bhupathy P, Babu GJ, Periasamy M. Sarcolipin and phospholamban as regulators of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42: 903-911.

Bodi I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA, Schwartz A. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest*. 2005;115: 3306-3317.

Bovo E, Lipsius SL, Zima AV. Reactive oxygen species contribute to the development of arrhythmogenic Ca<sup>2+</sup> waves during  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation in rabbit cardiomyocytes. *J Physiol*. 2012;590: 3291-3304.

Bowen TS, Mangner N, Werner S, Glaser S, Kullnick Y, Schrepper A, Doenst T, Oberbach A, Linke A, Steil L, Schuler G, Adams V. Diaphragm muscle weakness in mice is early-onset post-myocardial infarction and associated with elevated protein oxidation. *J Appl Physiol*. 2015;118: 11-19.

Brum PC, Rolim NP, Bacurau AV, Medeiros A. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. *An Acad Bras Cienc*. 2006;78: 485-503.

Burgoyne JR, Mongue-Din H, Eaton P, Shah AM. Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circ Res*. 2012;111: 1091-1106.

Cai WF, Liu GS, Lam CK, Florea S, Qian J, Zhao W, Pritchard T, Haghghi K, Lebeche D, Lu LJ, Deng J, Fan GC, Hajjar RJ, Kranias EG. Up-regulation of micro-RNA765 in human failing hearts is associated with post-transcriptional regulation of protein phosphatase inhibitor-1 and depressed contractility. *Eur J Heart Fail*. 2015;17: 782-793.

Camors E, Valdivia HH. CaMKII regulation of cardiac ryanodine receptors and inositol triphosphate receptors. *Front Pharmacol.* 2014;5: 101.

Chappel CI, Rona G, Balazs T, Gaudry R. Severe myocardial necrosis produced by isoproterenol in the rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1959;122: 123-128.

Chen L, Sampson KJ, Kass RS. Cardiac delayed rectifier potassium channels in health and disease. *Card Electrophysiol Clin.* 2016;8: 307-322.

Cooper PJ, Soeller C, Cannell MB. Excitation-contraction coupling in human heart failure examined by action potential clamp in rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49: 911-917.

Cros C, Brette F. Functional subcellular distribution of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic receptors in rat ventricular cardiac myocytes. *Physiol Rep.* 2013;1: e00038-e00038.

Curl CL, Danes VR, Bell JR, Raaijmakers AJA, Ip WTK, Chandramouli C, Harding TW, Porrello ER, Erickson JR, Charchar FJ, Kompa AR, Edgley AJ, Crossman DJ, Soeller C, Mellor KM, Kalman JM, Harrap SB, Delbridge LMD. Cardiomyocyte functional etiology in heart failure with preserved ejection fraction is distinctive-a new preclinical model. *J Am Heart Assoc.* 2018;7.

Currie S, Loughrey CM, Craig M-A, Smith GL. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II $\delta$  associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart. *Biochem J.* 2004;377: 357-366.

Currie S, Smith GL. Enhanced phosphorylation of phospholamban and downregulation of sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase type 2 (SERCA2) in cardiac sarcoplasmic reticulum from rabbits with heart failure. *Cardiovasc Res.* 1999;41: 135-146.

Cutler MJ, Jeyaraj D, Rosenbaum DS. Cardiac electrical remodeling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32: 174-180.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003;329: 23-38.

de Lucia C, Eguchi A, Koch WJ. New insights in cardiac  $\beta$ -adrenergic signaling during heart failure and aging. *Front Pharmacol.* 2018;9: 904.

de Lucia C, Femminella GD, Gambino G, Pagano G, Allocca E, Rengo C, Silvestri C, Leosco D, Ferrara N, Rengo G. Adrenal adrenoceptors in heart failure. *Front Physiol.* 2014;5: 246.

Del Monte F, Hajjar RJ. Intracellular devastation in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2008;13: 151-162.

Dianat M, Amini N, Badavi M, Farbood Y. Ellagic acid improved arrhythmias induced by CaCl<sub>2</sub> in the rat stress model. *Avicenna J Phytomed.* 2015;5: 120-127.

Doerries C, Grote K, Hilfiker-Kleiner D, Luchtefeld M, Schaefer A, Holland SM, Sorrentino S, Manes C, Schieffer B, Drexler H, Landmesser U. Critical role of the

NAD(P)H oxidase subunit p47<sup>phox</sup> for left ventricular remodeling/dysfunction and survival after myocardial infarction. *Circ Res.* 2007;100: 894-903.

Dontha S. A review on antioxidant methods. *Asian J Pharm Clin Res.* 2016;9.

Eager KR, Dulhunty AF. Activation of the cardiac ryanodine receptor by sulfhydryl oxidation is modified by Mg<sup>2+</sup> and ATP. *J Membr Biol.* 1998;163: 9-18.

Eisner DA, Caldwell JL, Kistamas K, Trafford AW. Calcium and excitation-contraction coupling in the heart. *Circ Res.* 2017;121: 181-195.

El-Bahr S. Biochemistry of free radicals and oxidative stress. *Sci Int.* 2013;1: 111-117.

Esposito G, Rapacciuolo A, Prasad SVN, Takaoka H, Thomas SA, Koch WJ, Rockman HA. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation.* 2002;105: 85-92.

Fearon IM, Palmer AC, Balmforth AJ, Ball SG, Varadi G, Peers C. Modulation of recombinant human cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_{1C}$  subunits by redox agents and hypoxia. *J Physiol.* 1999;514 629-637.

Ferreira AJ, Oliveira TL, Castro MC, Almeida AP, Castro CH, Caliarri MV, Gava E, Kitten GT, Santos RA. Isoproterenol-induced impairment of heart function and remodeling are attenuated by the nonpeptide angiotensin-(1-7) analogue AVE 0991. *Life Sci.* 2007;81: 916-923.

Filgueiras-Rama D. Sympathetic innervation and cardiac arrhythmias. In: Zipes DP, Jalife J, Stevenson WG, eds. *Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside.* 7th ed. Philadelphia: Elsevier; 2018, p:387-395.

Fischer TH, Maier LS, Sossalla S. The ryanodine receptor leak: how a tattered receptor plunges the failing heart into crisis. *Heart Fail Rev.* 2013;18: 475-483.

Fragoso J, Zarain-Herzberg A. SERCA2a: its role in the development of heart failure and as a potential therapeutic target. *Res Rep Clin Cardiol.* 2014;1: 43-55.

Freedman NJ, Lefkowitz RJ. Anti-beta(1)-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation. *J Clin Invest.* 2004;113: 1379-1382.

Gan M, Zheng T, Shen L, Tan Y, Fan Y, Shuai S, Bai L, Li X, Wang J, Zhang S, Zhu L. Genistein reverses isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by regulating miR-451/TIMP2. *Biomed Pharmacother.* 2019;112: 108618.

Gavioli M, Lara A, Almeida PW, Lima AM, Damasceno DD, Rocha-Resende C, Ladeira M, Resende RR, Martinelli PM, Melo MB, Brum PC, Fontes MA, Souza Santos RA, Prado MA, Guatimosim S. Cholinergic signaling exerts protective effects in models of sympathetic hyperactivity-induced cardiac dysfunction. *PLoS One.* 2014;9: e100179.

Gill JS, McKenna WJ, Camm AJ. Free radicals irreversibly decrease Ca<sup>2+</sup> currents in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol.* 1995;292: 337-340.

Goldspink DF, Burniston JG, Ellison GM, Clark WA, Tan L-B. Catecholamine-induced apoptosis and necrosis in cardiac and skeletal myocytes of the rat in vivo: the same or separate death pathways? *Exp Physiol*. 2004;89: 407-416.

Gomez AM, Valdivia HH, Cheng H, Lederer MR, Santana LF, Cannell MB, McCune SA, Altschuld RA, Lederer WJ. Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science*. 1997;276: 800-806.

Gong H, Li Y, Wang L, Lv Q, Wang X. Short-term effects of  $\beta$ 2-AR blocker ICI 118,551 on sarcoplasmic reticulum SERCA2a and cardiac function of rats with heart failure. *Exp Ther Med*. 2016;12: 1355-1362.

Grant AO. Cardiac ion channels. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2009;2: 185-194.

Grimm M, Brown JH. Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48: 322-330.

Grunnet M. Repolarization of the cardiac action potential. Does an increase in repolarization capacity constitute a new anti-arrhythmic principle? *Acta Physiol (Oxf)*. 2010;198 Suppl 676: 1-48.

Hafstad AD, Nabeebaccus AA, Shah AM. Novel aspects of ROS signalling in heart failure. *Basic Res Cardiol*. 2013;108: 359.

Handforth CP. Isoproterenol-induced myocardial infarction in animals. *Arch Pathol*. 1962;73: 161-165.

Hartupee J, Mann DL. Neurohormonal activation in heart failure with reduced ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14: 30-38.

Hasenfuss G, Mann DL. Pathophysiology of heart failure. In: Mann DL, Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E, eds. *Braunwald's heart disease : a textbook of cardiovascular medicine*. 10th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2015, p:442-461.

Hemmati AA, Olapour S, Varzi HN, Khodayar MJ, Dianat M, Mohammadian B, Yaghooti H. Ellagic acid protects against arsenic trioxide-induced cardiotoxicity in rat. *Hum Exp Toxicol*. 2018;37: 412-419.

Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G, Shah AM. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41: 2164-2171.

Hohimer AR, Davis LE, Hatton DC. Repeated daily injections and osmotic pump infusion of isoproterenol cause similar increases in cardiac mass but have different effects on blood pressure. *Can J Physiol Pharmacol*. 2005;83: 191-197.

Houser SR, Piacentino V, 3rd, Weisser J. Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32: 1595-1607.

Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*. 1999;341: 1276-1283.

Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Med J.* 2018;54: 287-293.

Jiang MT, Lokuta AJ, Farrell EF, Wolff MR, Haworth RA, Valdivia HH. Abnormal  $Ca^{2+}$  release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure. *Circ Res.* 2002;91: 1015-1022.

Jin L, Piao ZH, Sun S, Liu B, Kim GR, Seok YM, Lin MQ, Ryu Y, Choi SY, Kee HJ, Jeong MH. Gallic acid reduces blood pressure and attenuates oxidative stress and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Sci Rep.* 2017;7: 15607.

Kannan MM, Quine SD. Mechanistic clues in the protective effect of ellagic acid against apoptosis and decreased mitochondrial respiratory enzyme activities in myocardial infarcted rats. *Cardiovasc Toxicol.* 2012;12: 56-63.

Kannan MM, Quine SD. Ellagic acid inhibits cardiac arrhythmias, hypertrophy and hyperlipidaemia during myocardial infarction in rats. *Metabolism.* 2013;62: 52-61.

Kannan MM, Quine SD, Sangeetha T. Protective efficacy of ellagic acid on glycoproteins, hematological parameters, biochemical changes, and electrolytes in myocardial infarcted rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2012;26: 270-275.

Kanno S, Saffitz JE. The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Pathol.* 2001;10: 169-177.

Kassmann M, Hansel A, Leipold E, Birkenbeil J, Lu SQ, Hoshi T, Heinemann SH. Oxidation of multiple methionine residues impairs rapid sodium channel inactivation. *Pflugers Arch.* 2008;456: 1085-1095.

Kim N, Kim H, Youm JB, Park WS, Warda M, Ko JH, Han J. Site specific differential activation of ras/raf/ERK signaling in rabbit isoproterenol-induced left ventricular hypertrophy. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763: 1067-1075.

Kohler AC, Sag CM, Maier LS. Reactive oxygen species and excitation-contraction coupling in the context of cardiac pathology. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;73: 92-102.

Krijnen PA, Meischl C, Hack CE, Meijer CJ, Visser CA, Roos D, Niessen HW. Increased Nox2 expression in human cardiomyocytes after acute myocardial infarction. *J Clin Pathol.* 2003;56: 194-199.

Kubalova Z, Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Nishijima Y, Gyorke I, Terentyeva R, da Cunha DN, Sridhar A, Feldman DS, Hamlin RL, Carnes CA, Gyorke S. Abnormal intrastore calcium signaling in chronic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102: 14104-14109.

Lacampagne A, Duittoz A, Bolaños P, Peineau N, Argibay JA. Effect of sulfhydryl oxidation on ionic and gating currents associated with L-type calcium channels in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 1995;30: 799-806.

Landete JM. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. *Food Res Int.* 2011;5: 1150-1160.



Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension*. 2002;40: 477-484.

Linck B, Boknik P, Baba HA, Eschenhagen T, Haverkamp U, Jackel E, Jones LR, Kirchhefer U, Knapp J, Laer S, Muller FU, Schmitz W, Scholz H, Syska A, Vahlensieck U, Neumann J. Long-term beta adrenoceptor-mediated alteration in contractility and expression of phospholamban and sarcoplasmic reticulum  $Ca^{++}$ -ATPase in mammalian ventricle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;286: 531-538.

Lipskaia L, Chemaly ER, Hadri L, Lompre AM, Hajjar RJ. Sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10: 29-41.

Lipskaia L, Ly H, Kawase Y, Hajjar RJ, Lompre AM. Treatment of heart failure by calcium cycling gene therapy. *Future Cardiol*. 2007;3: 413-423.

Lissandron V, Zaccolo M. Compartmentalized cAMP/PKA signalling regulates cardiac excitation-contraction coupling. *J Muscle Res Cell Motil*. 2006;27: 399-403.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010;4: 118-126.

Looi YH, Grieve DJ, Siva A, Walker SJ, Anilkumar N, Cave AC, Marber M, Monaghan MJ, Shah AM. Involvement of Nox2 NADPH oxidase in adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. *Hypertension*. 2008;51: 319-325.

Lymperopoulos A, Rengo G, Koch WJ. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ Res*. 2013;113: 739-753.

Ma X, Song Y, Chen C, Fu Y, Shen Q, Li Z, Zhang Y. Distinct actions of intermittent and sustained  $\beta$ -adrenoceptor stimulation on cardiac remodeling. *Sci China Life Sci*. 2011;54: 493-501.

MacLeod KT, Marston SB, Poole-Wilson PA, Severs NJ, Sugden PH. Cardiac myocytes and the cardiac action potential. In: Warrell DA, Cox TM, Firth JD, eds. *Oxford Textbook of Medicine*. 5th ed. New York: Oxford University Press; 2010, p:2603-2617.

Madamanchi A.  $\beta$ -Adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *McGill journal of medicine : MJM : an international forum for the advancement of medical sciences by students*. 2007;10: 99-104.

Maier LS.  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in the heart. In: Islam MS, eds. *Calcium Signaling*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2012, p:685-702.

Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKII $\delta$  overexpression uniquely alters cardiac myocyte  $Ca^{2+}$  handling: reduced SR  $Ca^{2+}$  load and activated SR  $Ca^{2+}$  release. *Circ Res*. 2003;92: 904-911.

Marks AR. Calcium cycling proteins and heart failure: mechanisms and therapeutics. *J Clin Invest*. 2013;123: 46-52.

Mathew B, Tiwari A, Jatawa S. Free radicals and antioxidants: A review. *J Pharm Res.* 2011;4: 4340-4343.

Mattiazzi A, Bassani RA, Escobar AL, Palomeque J, Valverde CA, Vila Petroff M, Bers DM. Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;308: 1177-1191.

Meszaros J, Levai G. Ultrastructural and electrophysiological alterations during the development of catecholamine-induced cardiac hypertrophy and failure. *Acta Biol Hung.* 1990;41: 289-307.

Mikusova A, Kralova E, Tylkova L, Novotova M, Stankovicova T. Myocardial remodelling induced by repeated low doses of isoproterenol. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009;87: 641-651.

Morisco C, Zebrowski DC, Vatner DE, Vatner SF, Sadoshima J. Beta-adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the beta(1)-subtype in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33: 561-573.

Mukherjee R, Hewett KW, Walker JD, Basler CG, Spinale FG. Changes in L-type calcium channel abundance and function during the transition to pacing-induced congestive heart failure. *Cardiovasc Res.* 1998;37: 432-444.

Mukherjee R, Spinale FG. L-type calcium channel abundance and function with cardiac hypertrophy and failure: a review. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30: 1899-1916.

Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, Shah AM. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc Res.* 2006;71: 208-215.

Nabeebaccus A, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidases and cardiac remodelling. *Heart Fail Rev.* 2011;16: 5-12.

Nadruz W. Myocardial remodeling in hypertension. *J Hum Hypertens.* 2015;29: 1-6.

Najafi A, Sequeira V, Kuster DWD, van der Velden J.  $\beta$ -adrenergic receptor signalling and its functional consequences in the diseased heart. *Eur J Clin Invest.* 2016;46: 362-374.

Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15: 387-407.

Namekata I, Hamaguchi S, Wakasugi Y, Ohhara M, Hirota Y, Tanaka H. Ellagic acid and gingerol, activators of the sarco-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, ameliorate diabetes mellitus-induced diastolic dysfunction in isolated murine ventricular myocardia. *Eur J Pharmacol.* 2013;706: 48-55.

Nass RD, Aiba T, Tomaselli GF, Akar FG. Mechanisms of disease: ion channel remodeling in the failing ventricle. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008;5: 196-207.

Neef S, Maier LS. Novel aspects of excitation-contraction coupling in heart failure. *Basic Res Cardiol.* 2013;108: 360.

Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev.* 2005;85: 1205-1253.

Nichtova Z, Novotova M, Kralova E, Stankovicova T. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol. *Gen Physiol Biophys.* 2012;31: 141-151.

Niwa N, Nerbonne JM. Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current ( $I_{to}$ ) expression and regulation. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48: 12-25.

Olgar Y, Ozturk N, Usta C, Puddu PE, Ozdemir S. Ellagic acid reduces L-type  $Ca^{2+}$  current and contractility through modulation of NO-GC-cGMP pathways in rat ventricular myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014;64: 567-573.

Osadchii OE. Cardiac hypertrophy induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects. *Heart Fail Rev.* 2007;12: 66-86.

Ostadal B, Rychterova V, Poupá O. Isoproterenol-induced acute experimental cardiac necrosis in the turtle (*Testudo Horsfieldi*). *Am Heart J.* 1968;76: 645-649.

Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Hirase T, Ohashi Y, Inoue N, Hirata K, Yokoyama M. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase attenuates cardiac hypertrophy induced by chronic isoproterenol infusion. *Circ J.* 2002;66: 851-856.

Patel VB, Wang Z, Fan D, Zhabyeyev P, Basu R, Das SK, Wang W, Desaulniers J, Holland SM, Kassiri Z, Oudit GY. Loss of p47phox subunit enhances susceptibility to biomechanical stress and heart failure because of dysregulation of cortactin and actin filaments. *Circ Res.* 2013;112: 1542-1556.

Perjés Á, Kubin AM, Kónyi A, Szabados S, Cziráki A, Skoumal R, Ruskoaho H, Szokodi I. Physiological regulation of cardiac contractility by endogenous reactive oxygen species. *Acta Physiol (Oxf).* 2012;205: 26-40.

Pinnell J, Turner S, Howell S. Cardiac muscle physiology. *BJA Education.* 2007;7: 85-88.

Pluim BM, Zwinderman AH, van der Laarse A, van der Wall EE. The athlete's heart. a meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation.* 2000;101: 336-344.

Polizio AH, Balestrasse KB, Yannarelli GG, Noriega GO, Gorzalczany S, Taira C, Tomaro ML. Angiotensin II regulates cardiac hypertrophy via oxidative stress but not antioxidant enzyme activities in experimental renovascular hypertension. *Hypertens Res.* 2008;31: 325-334.

Port JD, Bristow MR. Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33: 887-905.

Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS, Mohan H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *J Agric Food Chem.* 2002;50: 2200-2206.

Reboul C, Boissiere J, Andre L, Meyer G, Bideaux P, Fouret G, Feillet-Coudray C, Obert P, Lacampagne A, Thireau J, Cazorla O, Richard S. Carbon monoxide pollution

aggravates ischemic heart failure through oxidative stress pathway. *Sci Rep.* 2017;7: 39715.

Rios JL, Giner RM, Marin M, Recio MC. A pharmacological update of ellagic acid. *Planta Med.* 2018;84: 1068-1093.

Roche A, Ross E, Walsh N, O'Donnell K, Williams A, Klapp M, Fullard N, Edelstein S. Representative literature on the phytonutrients category: phenolic acids. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57: 1089-1096.

Ryu Y, Jin L, Kee HJ, Piao ZH, Cho JY, Kim GR, Choi SY, Lin MQ, Jeong MH. Gallic acid prevents isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and fibrosis through regulation of JNK2 signaling and Smad3 binding activity. *Sci Rep.* 2016;6: 34790.

Sag CM, Santos CX, Shah AM. Redox regulation of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;73: 103-111.

Sag CM, Wadsack DP, Khabbazzadeh S, Abesser M, Grefe C, Neumann K, Opiela MK, Backs J, Olson EN, Brown JH, Neef S, Maier SK, Maier LS. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to cardiac arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Heart Fail.* 2009;2: 664-675.

Salazar NC, Chen J, Rockman HA. Cardiac GPCRs: GPCR signaling in healthy and failing hearts. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768: 1006-1018.

Saleem N, Prasad A, Goswami SK. Apocynin prevents isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rat. *Mol Cell Biochem.* 2018;445: 79-88.

Santana LF, Cheng EP, Lederer WJ. How does the shape of the cardiac action potential control calcium signaling and contraction in the heart? *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49: 901-903.

Santos CX, Raza S, Shah AM. Redox signaling in the cardiomyocyte: from physiology to failure. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;74: 145-151.

Sato PY, Chuprun JK, Schwartz M, Koch WJ. The evolving impact of G protein-coupled receptor kinases in cardiac health and disease. *Physiol Rev.* 2015;95: 377-404.

Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr.* 2005;81: 215-217.

Schlaich MP, Kaye DM, Lambert E, Sommerville M, Socratous F, Esler MD. Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy. *Circulation.* 2003;108: 560-565.

Schwinger RH, Munch G, Bolck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E. Reduced  $Ca^{2+}$ -sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31: 479-491.

Selvetella G, Lembo G. Mechanisms of cardiac hypertrophy. *Heart Fail Clin.* 2005;1: 263-273.

Shanmugam M, Gao S, Hong C, Fefelova N, Nowycky MC, Xie LH, Periasamy M, Babu GJ. Ablation of phospholamban and sarcolipin results in cardiac hypertrophy and decreased cardiac contractility. *Cardiovasc Res*. 2011;89: 353-361.

Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;97: 245-262.

Sirker A, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies. *Basic Res Cardiol*. 2011;106: 735-747.

Song YH, Cho H, Ryu SY, Yoon JY, Park SH, Noh CI, Lee SH, Ho WK. L-type  $Ca^{2+}$  channel facilitation mediated by  $H_2O_2$ -induced activation of CaMKII in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48: 773-780.

Sossalla S, Fluschnik N, Schotola H, Ort KR, Neef S, Schulte T, Wittkopper K, Renner A, Schmitto JD, Gummert J, El-Armouche A, Hasenfuss G, Maier LS. Inhibition of elevated  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II improves contractility in human failing myocardium. *Circ Res*. 2010;107: 1150-1161.

Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;928: 22-38.

Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 2003;25: 207-218.

Stansfield WE, Ranek M, Pendse A, Schisler JC, Wang S, Pulinilkunnil T, Willis MS. The pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure. In: Willis MS, Homeister JW, Stone JR, eds. *Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease*. San Diego: Academic Press; 2014, p:51-78.

Stewart JM, Patel MB, Wang J, Ochoa M, Gewitz M, Loud AV, Anversa P, Hintze TH. Chronic elevation of norepinephrine in conscious dogs produces hypertrophy with no loss of LV reserve. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1992;262: 331-339.

Suzuki M, Ohte N, Wang ZM, Williams DL, Jr., Little WC, Cheng CP. Altered inotropic response of endothelin-1 in cardiomyocytes from rats with isoproterenol-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 1998;39: 589-599.

Swaminathan PD, Purohit A, Hund TJ, Anderson ME. Calmodulin-dependent protein kinase II: linking heart failure and arrhythmias. *Circ Res*. 2012;110: 1661-1677.

Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Valenzuela C, Delpon E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res*. 2004;62: 9-33.

Terentyev D, Gyorke I, Belevych AE, Terentyeva R, Sridhar A, Nishijima Y, de Blanco EC, Khanna S, Sen CK, Cardounel AJ, Carnes CA, Gyorke S. Redox modification of ryanodine receptors contributes to sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  leak in chronic heart failure. *Circ Res*. 2008;103: 1466-1472.

Tham YK, Bernardo BC, Ooi JY, Weeks KL, McMullen JR. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol*. 2015;89: 1401-1438.

Tomaselli GF. Principles of Electrophysiology. In: Loscalzo J, eds. Harrison's Cardiovascular Medicine. 3rd New York: McGraw-Hill Education; 2010, p:122-131.

Tomita H, Nazmy M, Kajimoto K, Yehia G, Molina CA, Sadoshima J. Inducible cAMP early repressor (ICER) Is a negative-feedback regulator of cardiac hypertrophy and an important mediator of cardiac myocyte apoptosis in response beta-adrenergic receptor stimulation. *Circ Res.* 2003;93: 12-22.

Treiny R, Jurevicius J. L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the heart: structure and regulation. *Medicina (Kaunas).* 2008;44: 491-499.

Tristani-Firouzi M, Chen J, Mitcheson JS, Sanguinetti MC. Molecular biology of  $\text{K}^{+}$  channels and their role in cardiac arrhythmias. *Am J Med.* 2001;110: 50-59.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39: 44-84.

van Berlo JH, Maillet M, Molkentin JD. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *J Clin Invest.* 2013;123: 37-45.

Vangheluwe P, Sipido KR, Raeymaekers L, Wuytack F. New perspectives on the role of SERCA2's  $\text{Ca}^{2+}$  affinity in cardiac function. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763: 1216-1228.

Varro A, Papp JG. The impact of single cell voltage clamp on the understanding of the cardiac ventricular action potential. *Cardioscience.* 1992;3: 131-144.

Villeneuve N, Canet E, Vilaine J. Servier's partnership with ARMGO Pharma: targeting heart failure by inhibiting cardiac  $\text{RyR}_2$  calcium leak. *Medicographia.* 2014;36: 349-354.

Wagner S, Rokita AG, Anderson ME, Maier LS. Redox regulation of sodium and calcium handling. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18: 1063-1077.

Walker CA, Spinale FG. The structure and function of the cardiac myocyte: a review of fundamental concepts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;118: 375-382.

Wang D, Shan Y, Huang Y, Tang Y, Chen Y, Li R, Yang J, Huang C. Vasostatin-1 stops structural remodeling and improves calcium handling via the eNOS-NO-PKG pathway in rat hearts subjected to chronic  $\beta$ -adrenergic receptor activation. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2016;30: 455-464.

Wang J, Gareri C, Rockman HA. G-protein-coupled receptors in heart disease. *Circ Res.* 2018;123: 716-735.

Wehr NB, Levine RL. Quantification of protein carbonylation. *Methods Mol Biol.* 2013;965: 265-281.

Wehrens XH, Marks AR. Altered function and regulation of cardiac ryanodine receptors in cardiac disease. *Trends Biochem Sci.* 2003;28: 671-678.

- Xiang Y, Kobilka BK. Myocyte adrenoceptor signaling pathways. *Science*. 2003;300: 1530-1532.
- Xu KY, Zweier JL, Becker LC. Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circ Res*. 1997;80: 76-81.
- Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science*. 1998;279: 234-237.
- Yan LJ, Sohal RS. Prevention of flight activity prolongs the life span of the housefly, *musca domestica*, and attenuates the age-associated oxidative damage to specific mitochondrial proteins. *Free Radic Biol Med*. 2000;29: 1143-1150.
- Yan Y, Liu J, Wei C, Li K, Xie W, Wang Y, Cheng H. Bidirectional regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  sparks by mitochondria-derived reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. 2008;77: 432-441.
- Yang L, Liu G, Zakharov SI, Morrow JP, Rybin VO, Steinberg SF, Marx SO. Ser1928 is a common site for Cav1.2 phosphorylation by protein kinase C isoforms. *J Biol Chem*. 2005;280: 207-214.
- Yeh JL, Hsu JH, Wu PJ, Liou SF, Liu CP, Chen IJ, Wu BN, Dai ZK, Wu JR. KMUP-1 attenuates isoprenaline-induced cardiac hypertrophy in rats through NO/cGMP/PKG and ERK1/2/calcineurin A pathways. *Br J Pharmacol*. 2010;159: 1151-1160.
- Yousef AI, El-Masry OS, Yassin EH. The anti-oncogenic influence of ellagic acid on colon cancer cells in leptin-enriched microenvironment. *Tumour Biol*. 2016;37: 13345-13353.
- Yu YM, Chang WC, Wu CH, Chiang SY. Reduction of oxidative stress and apoptosis in hyperlipidemic rabbits by ellagic acid. *J Nutr Biochem*. 2005;16: 675-681.
- Zeb A. Ellagic acid in suppressing in vivo and in vitro oxidative stresses. *Mol Cell Biochem*. 2018;448: 27-41.
- Zhang R, Khoo MS, Wu Y, Yang Y, Grueter CE, Ni G, Price EE, Jr., Thiel W, Guatimosim S, Song LS, Madu EC, Shah AN, Vishnivetskaya TA, Atkinson JB, Gurevich VV, Salama G, Lederer WJ, Colbran RJ, Anderson ME. Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat Med*. 2005;11: 409-417.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

|                     |            |                |                            |
|---------------------|------------|----------------|----------------------------|
| <b>Adı</b>          | Bilge Eren | <b>Uyruğu</b>  | T.C.                       |
| <b>Soyadı</b>       | YAMASAN    | <b>Tel no</b>  |                            |
| <b>Doğum tarihi</b> | 18.03.1987 | <b>e-posta</b> | berenyamasan@trakya.edu.tr |

### Eğitim Bilgileri

|                      | <b>Mezun olduğu kurum</b> | <b>Mezuniyet yılı</b> |
|----------------------|---------------------------|-----------------------|
| <b>Lise</b>          | Muğla Turgut Reis Lisesi  | 2004                  |
| <b>Lisans</b>        | Muğla Üniversitesi        | 2009                  |
| <b>Yüksek Lisans</b> | Trakya Üniversitesi       | 2013                  |

### İş Deneyimi

| <b>Görevi</b>     | <b>Kurum</b>         | <b>Süre (yıl-yıl)</b> |
|-------------------|----------------------|-----------------------|
| <b>Araş. Gör.</b> | Trakya Üniversitesi  | 2011-2013             |
| <b>Araş. Gör.</b> | Akdeniz Üniversitesi | 2014-2018             |
| <b>Araş. Gör.</b> | Trakya Üniversitesi  | 2018-                 |

| <b>Yabancı Dilleri</b> | <b>Sınav türü</b> | <b>Puanı</b> |
|------------------------|-------------------|--------------|
| <b>İngilizce</b>       | YÖKDİL            | 72.50        |

### Yayınlar:

1. Kucuk M, Celen MC, **Yamasan BE**, Kucukseymen S, Ozdemir S. (2018) "Effects of prasugrel on membrane potential and contractile activity of rat ventricular myocytes" Pharmacological Reports, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2017.08.015>.
2. Olgar Y, Celen MC, **Yamasan BE**, Ozturk N, Turan B, Ozdemir S. (2017) "Rho-kinase inhibition reverses impaired Ca<sup>2+</sup> handling and associated left ventricular dysfunction in pressure overload-induced cardiac hypertrophy" Cell Calcium, 67, 81-90.
3. Palabıyık O, Karaca A, Taştekin E, **Yamasan BE**, Tokuç B, Sipahi T, Vardar SA. (2016) "The Effect of a High-Protein Diet and Exercise on Cardiac AQP7 and GLUT4 Gene Expression" Biochemical Genetics, 54(5), 731-45.
4. Kucuk M, Celen MC, **Yamasan BE**, Olgar Y, Ozdemir S. (2015) "Effects of Ticagrelor on Ionic Currents and Contractility in Rat Ventricular Myocytes" Cardiovascular Drugs and Therapy, 29(5), 419-424.
5. Olgar Y, Hidisoglu E, Celen MC, **Yamasan BE**, Yargicoglu P, Ozdemir S. (2015) "2.1 GHz electromagnetic field does not change contractility and intracellular Ca<sup>2+</sup> transients but decreases  $\beta$ -adrenergic responsiveness through nitric oxide signaling in rat ventricular myocytes" International Journal of



Radiation Biology, 91(10), 851-857.

6. Guldiken B, Sipahi T, Tekinarslan R, Kabayel L, Ozkan H, Unlu A, **Yamasan BE**, Okman-Kilic T, Turgut N. (2013) "Calcitonin gene related peptide gene polymorphism in migraine patients" The Canadian Journal of Neurological Sciences, 40(05), 722-725.

#### **Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:**

1. Celen MC, Küçük M, **Yamasan BE**, Kucukseymen S, Ozdemir S. "Prasugrel affects membrane potential and contractile functions of rat ventricular myocytes" 34<sup>th</sup> Meeting of the European Section of the International Society for Heart Research, 24-27 Temmuz 2017, Hamburg/Almanya (Poster)
2. Mercan T, **Yamasan BE**, Erkan O, Ozdemir S. "Acute effects of thymoquinone on electrophysiological parameters of rat ventricular myocytes" 34<sup>th</sup> Meeting of the European Section of the International Society for Heart Research, 24-27 Temmuz 2017, Hamburg/Almanya (Poster)
3. Celen MC, **Yamasan BE**, Olgar Y, Ozdemir S. "Inhibition of Rho Kinase (ROCK) Restores Ionic Currents and Prevents Electrical Remodelling of Heart in Pressure Overload Induced Hypertrophy Model" XXII ISHR World Congress, 18-21 Nisan 2016, Buenos Aires/Arjantin (Poster)
4. **Yamasan BE**, Olgar Y, Hidisoglu E, Celen MC, Yargicoglu P, Ozdemir S. "Effects of The Long-Term Exposure to 2.1 GHz Electromagnetic Fields on Contractility and Intracellular Ca<sup>+2</sup> Homeostasis in Rat Ventricular Myocytes" 33<sup>rd</sup> Annual Meeting Of The European Section of The ISHR, 1-4 Temmuz 2015 Bordeaux/Fransa (Poster)
5. Ozdemir S, Olgar Y, Celen MC, **Yamasan BE**, Öztürk NE. "Effects Of Rho Kinase (Rock) Inhibition On Pressure Overload Induced Cardiac Hypertrophy And Contractile Dysfunction In Rat" 33<sup>rd</sup> Annual Meeting Of The European Section of The ISHR, 1-4 Temmuz 2015 Bordeaux/Fransa (Poster)
6. Celen MC, Olgar Y, **Yamasan BE**, Ozdemir S. "Acute Effect of Rosuvastatin on Electrophysiological Parameters of Rat Cardiac Myocyte" 33<sup>rd</sup> Annual Meeting Of The European Section of The ISHR, 1-4 Temmuz 2015 Bordeaux/Fransa (Poster)
7. Palabiyik O, Karaca A, Vardar SA, Taştekin E, **Yamasan BE**, Tokuç B, Sipahi T. "Effect Of High Protein Diet And Exercise On Cardiac Aquaporin 7 Expression" Joint Meeting Of The Federation Of European Physiological Societies (FEPS) and The Hungarian Physiological Society, 27-30 Ağustos 2014 Budapeşte/Macaristan (Poster)
8. **Yamasan BE**, Korkmaz S, Palabiyik O. "Investigation of angiotensinogen M235T and T174M gene polymorphisms in coronary artery disease" Annual Meeting of the German Biophysical Society (DGfB), 14-17 Eylül 2014 Hamburg/Almanya (Poster)

### Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

1. **Yamasan BE**, Mercan T, Çelen MC, Özdemir S. “Akut Rosuvastatin Uygulamasının Sıçan Sol Ventrikül Miyositleri Üzerine Etkisi” 28-29. Ulusal Biyofizik Kongresi (Uluslararası Katılımlı) (2017) (Sözlü)
2. Çelen MC, **Yamasan BE**, Olgar Y, Özdemir S. “Basınç Yüklemesine Bağlı Kardiyak Hipertrofide Rho/Rock Yolağı İnhibisyonun İyonik Akımlara Etkisinin İncelenmesi” 28-29. Ulusal Biyofizik Kongresi (Uluslararası Katılımlı) (2017) (Sözlü)
3. **Yamasan BE**, Oztürk NE, Olgar Y, Er H, Ozdemir S. “Yüzme Egzersizinin Dişi Sıçanların Ventrikül Miyositlerinin Hücre İçi  $Ca^{+2}$  Düzenlenmesindeki Yaşlanmaya Bağlı Değişikliklere Etkisi” 27. Ulusal Biyofizik Kongresi (2015) (Poster)
4. Ozdemir S, Olgar Y, Celen MC, **Yamasan BE**, Öztürk NE. “Rho-Kinaz İnhibisyonunun Patolojik Kardiyak Hipertrofide Bozulan Miyositlerin  $Ca^{+2}$  Regülasyonu Üzerindeki Etkisi” 27. Ulusal Biyofizik Kongresi (2015) (Poster)
5. Palabiyik O, Karaca A, Vardar SA, Taştekin E, **Yamasan BE**, Tokuç B, Sipahi T. “Yüksek Protein Diyeti ve Egzersizin Kardiyak Aquaporin 7 ve GLUT4 Gen İfadelerine Etkisi” Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi (2014) (Poster)
6. **Yamasan BE**, Gülyaşar T, Sipahi T, Korkmaz S, Sivri N, Palabiyik O. “Koroner Arter Hastalığında Anjiyotensinojen M235T ve T174M Gen Polimorfizimlerinin Araştırılması ve Risk Faktörlerinin Belirlenmesi” 25. Ulusal Biyofizik Kongresi (2013) (Sözlü)
7. **Yamasan BE**, Bakay D, Ünlü A, Erkan O, Karlıkaya CH, Sipahi T. “Astım Hastalarında Endotelial Nitrik Oksit Sentaz İntron 4 Vntr Gen Polimorfizminin Araştırılması. 24. Ulusal Biyofizik Kongresi (2012) (Poster)