

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyofizik Anabilim Dalı

ELLAGİK ASİDİN SIÇAN
KARDİYOMİYOSİTLERİNİN KONTRAKTİLİTESİ VE
KALSİYUM AKIMLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Yusuf OLĞAR

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2013

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyofizik Anabilim Dalı

ELLAGİK ASİDİN SIÇAN
KARDİYOMİYOSİTLERİNİN KONTRAKTİLİTESİ VE
KALSİYUM AKIMLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Yusuf OLGAR

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Semir ÖZDEMİR

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No:2011.02.0122.011)

“Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yararlanılabilir.”

Antalya, 2013

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyofizik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 28/06/2013

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Semir ÖZDEMİR**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. Piraye YARGIÇOĞLU**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. Coşkun USTA**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

Üye : **Doç. Dr. İbrahim BAŞARICI**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kardiyoloji Anabilim Dalı

Üye : **Doç. Dr. Nazmi YARAŞ**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyofizik Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü yönetim kurulunun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Son yıllarda yapılan çalışmalarda fenolik yapıların birçok biyolojik etkisinin olduğu gösterilmiştir. Bu fenolik bileşiklerden biri olan ellagik asidin (EA) kardiyoprotektif etkisi olduğu ileri sürülmektedir. Bu çerçevede çalışmamızda EA'nın ventrikül miyositlerinin Ca^{2+} akımlarına etkisi ve bu etkinin altında yatan mekanizmaların araştırılması amaçlanmıştır.

Deneyle sığan kalbinden izole edilen ventrikül miyositlerinde gerçekleştirilmiştir. Akut EA uygulamasının L-tipi Ca^{2+} akımlarını anlamlı olarak azalttığı, ancak aktivasyon ve inaktivasyon kinetiklerine ait parametreleri etkilemediği görülmüştür. Ellagik asidin Ca^{2+} akımlarını baskılayıcı etkisinin doz bağımlı olduğu tespit edilmiş ve EC_{50} değeri 23 nM olarak hesaplanmıştır. Adenilil siklaz inhibitörü (SQ 22536, 10 μ M) ve antioksidan (probucol, 5 μ M) varlığına rağmen EA'nın Ca^{2+} akımlarını azaltıcı etkisi devam etmiştir. Ancak Nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü (L-NAME, 500 μ M) ve guanilil siklaz (GS) inhibitörü (ODQ, 1 μ M) varlığında ise ilginç bir şekilde EA'nın azaltıcı etkisinin ortadan kalktığı görülmüştür. Ayrıca, EA konsantrasyonla orantılı bir şekilde fraksiyonel kısalmayı azaltmış, aksiyon potansiyelinin repolarizasyon süresini ise anlamlı olarak uzatmıştır.

Sonuç olarak, EA nanomolar konsantrasyonlarda bile kardiyomiyositlerin iyonik ve mekanik özelliklerini etkilemektedir. Bu veriler EA'nın Ca^{2+} akımlarına olan azaltıcı etkisinin NOS-GS-cGMP aracılığıyla gerçekleştiğini göstermektedir. EA'nın fraksiyonel kısalmayı azaltması negatif inotropik etkisinin olduğunu göstermekte, aksiyon potansiyeli repolarizasyon süresini uzatması ise potasyum akımları üzerinde de etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Ellagik Asit, Ca^{2+} Akımları, Fraksiyonel Kısalma,
Aksiyon Potansiyeli.

ABSTRACT

Recent evidences have shown that phenolic structures exert many biological functions. Ellagic acid (EA), a phenolic compound, has been suggested to have cardioprotective effects. In this study we aimed to investigate the effect of EA on cardiac Ca^{2+} currents and contractility in rat ventricular myocytes and to elucidate the underlying mechanisms of these changes.

All records measured from the freshly isolated ventricular myocytes of rat heart. We found that EA dose dependently reduced Ca^{2+} currents with $\text{EC}_{50}=23$ nM. EA decreased voltage dependent L-type Ca^{2+} current density (I_{CaL}) but it didn't affect the inactivation and reactivation parameters. Inhibition of adenylate cyclase (AC) with SQ 22536(10 μM) and using antioxidant (probucol) had no effect on EA modulation of I_{CaL} . Interestingly, blockage of nitric oxide synthase (NOS) with L-NAME and guanylate cyclase (GC) with ODQ (1 μM) abolished inhibitory effect of EA on I_{CaL} . Moreover, EA dose dependently blunted fractional shortening of ventricular myocytes. Besides, EA application revealed a significant prolongation in action potential duration (APD) in ventricular myocytes.

In conclusion, EA affects ionic and mechanical properties of ventricular myocytes even at nanomolar concentrations. It reduces I_{CaL} and fractional shortening and prolongs APD significantly. These findings indicated that EA suppresses I_{CaL} and exerts negative inotropic effects through activation of NOS-GC-cGMP pathway. On the other hand, AP prolongation implies that EA might also have effect on potassium currents.

Key Words: Ellagic Acid, Ca^{2+} Currents, Fractional Shortening,
Action Potential.

TEŞEKKÜR

Bu alıőmanın yapılması için gerekli tm olanakları sağlayan, yüksek lisans eğitimim sresince ilgisini ve desteğini esirgemeyen değerli danıőman hocam sayın Doç. Dr. Semir ÖZDEMİR'e, çalıőmanın yürütülmesinde engin bilgilerini bizimle paylaőan sayın Prof. Dr. Coşkun USTA'ya, çalıőmalarımnda maddi ve manevi katkıları olan ve her zaman desteğini grdğim değerli çalışma arkadaőım Nihal ÖZTÜRK'e, teknik olanakları ile bu çalıőmanın belirli basamaklarının gerçekleőmesini sağlayan Deney Hayvanları nitesi çalıőanlarına ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1 Polifenoller ve Genel Özellikleri	3
2.2. Ellagitaninler ve Ellagik Asit	5
2.3. Ellagik Asit ve Ellagitanin Bitkisel Kaynakları	6
2.4. ET ve EA Metabolizması	7
2.5. Ellagik Asidin Biyolojik Fonksiyonları	10
2.5.1 Antioksidan etkileri	11
2.5.2. Antikarsinojen etkileri	12
2.5.3. Kardiyoprotektif etkileri	13
2.6. Kalp kasının yapısı	14
2.7. Kalpteki elektrofizyolojik olaylar	14
2.7.1. Kalpte uyarılma-kasılma çiftlenimi	14
2.7.2. Miyokardiyal Ca ²⁺ homeostazisinin düzenlenmesi	16
MATERYAL ve METOT	20
3.1. Deney gruplarının oluşturulması	20
3.2. Kardiyak Miyositlerin İzolasyonu	20
3.3. L-tipi Ca ²⁺ Akımlarının Kaydedilmesi	20

3.4.	Kontraktıl parametreler	20
3.5.	Aksiyon Potansiyeli Kayıtları	22
3.6.	Kullanılan kimyasallar	22
3.7.	İstatistiksel Analiz	23
BULGULAR		24
4.1.	Doz yanıt eğrisinin oluşturulması	24
4.2.	Ellagik asidin ICaL'a etkisi	25
4.3.	Ellagik asidin etki mekanizması	28
4.3.1.	β -adrenerjik sistem inhibisyonu	27
4.3.2.	Antioksidan Sistem Aktivasyonu	28
4.3.3.	NOS-GS-cGMP yolağının rolü	29
4.4.	Ellagik asidin kasılma parametrelerine etkisi	31
4.5.	Ellagik Asidin aksiyon potansiyeline olan etkisi	32
TARTIŞMA		33
SONUÇLAR		38
KAYNAKLAR		39
ÖZGEÇMİŞ		49

SİMGELER ve KISALTMALAR

EA	: Ellagik Asit
ET	: Ellagitanin
AP	: Aksiyon Potansiyeli
APD	: Aksiyon Potansiyeli Süresi
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
PDE	: Fosfodiesteraz
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
nNOS	: Norönel Nitrik Oksit Sentaz
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit
[Ca]_i	: İntraselüler Kalsiyum
CICR	: Kalsiyum İndüklü Kalsiyum Salınımı
ORAK	: Oksijen Radikalleri Absorbans Kapasitesi
PKG	: Protein kinaz G
LTCC	: L tipi Kalsiyum Kanalı
NFκB	: Nüklear Faktör Kapa B
AP	: Aktivatör Protein
SOD	: Superoksit Dismutaz
CAT	: Katalaz
GST	: Glutatyon S-transferaz
PKA	: Protein Kinaz A
PKC	: Protein Kinaz C
GS	: Guanilat Siklaz
AS	: Adenilat Siklaz
SR	: Sarkoplazmik Retikulum
HHDP	: Hegza-hidroksi-difenol
RyR	: Riyanodin reseptörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Ellagik asidin moleküler yapısı	4
2.2. Ellagitaninlerin Ellagik aside dönüşmesi	5
2.3. Polifenollerin sindirimi ve emiliminin temel basamakları	8
2.4. Polifenollerin absorpsiyonu sindirimi ve atılımı	8
2.5. Ellagik asit türevlerinin absorpsiyonu	14
2.6. Ventrikül Hücrelerinde hücre içi kalsiyumun düzenlenmesi	15
2.7. Ventrikül AP'nin evreleri ve onlara karşılık gelen iyon akımları	16
2.8. β -adrenerjik aktivasyon	16
2.9. NO'nun kalpteki iyonik mekanizmalara etkisi	19
3.1. Sığan kalbi izolasyonunun temel basamakları	20
3.2. Elektrik alan altında kasılma parametrelerinin alınması	
3.3. Sol ventrikül hücrelerden kaydedilen bir AP eğrisi üzerinde ölçülen parametreler	21
4.1. Farklı dozlardaki EA'nın I_{CaL} akımlarına etkisi	23
4.2. Ventrikül hücrelerinden EA varlığında kaydedilen ortalama I_{CaL} akım yoğunluklarının değişimi ve örnek akım kayıtları.	24
4.3. Ellagik asidin I_{CaL} yoğunluğu ve kinetik parametrelerine etkisi	25
4.4. SQ 22536(AS inhibitörü) varlığında EA'nın I_{CaL} 'a etkisi	26
4.5. Probucol (antioksidan) varlığında EA'nın I_{CaL} 'a etkisi	27
4.6. L-NAME (NOS inhibitörü) varlığında EA'nın I_{CaL} 'a etkisi	28
4.7. ODQ (GS inhibitörü) varlığında EA'nın I_{CaL} 'a etkisi	29
4.8. Ellagik asidin EC_{50} ve (maksimum dozlarının 1 Hz frekanslı alan uyarısı altında kasılmaya etkisi	30
4.9. Ellagik asidin (1 μ M) miyosit aksiyon potansiyeline etkisi	33

TABLULAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
1.	Bazı bitki türlerinde bulunan EA miktarları	7
2.	Bazı meyve türlerinde ellagik asit ve antosiyanin miktarına bağlı gözlenen ORAK(Oksijen Radikalleri Absorbans Kapasitesi) değerleri	11
3.	Ellagik asidin varlığında kaydedilen Ca ²⁺ akımlarının yoğunluğu ve kinetik parametrelerinin değerleri	24

GİRİŞ

Son zamanlarda polifenoller, flavon ve flavonoid gibi yapıların önemi giderek artmaktadır. Güncel çalışmalar meyvelerde bolca bulunan bu yapıların tat ve lezzet özellikleri dışında çeşitli biyolojik etkilerinin olduğunu da göstermektedir. Özellikle fenolik yapıdaki bileşiklerin gerek güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olması, gerekse meyvelerde yüksek miktarda bulunması sebebiyle sağlık açısından önemi gün geçtikçe daha da değer kazanmakta ve bu nedenle araştırmacıların ilgisini çekmektedir [1, 2].

1990'lı yıllardan başlayarak günümüze kadar yapılan çalışmalarda diyetle alınan ve tıbbi açıdan faydalar sağlayabilen bitkilerin "nutraceutical" veya "functional foods" olarak tanımlandığı gözlenmektedir. Özellikle çilek, ahududu, böğürtlen gibi üzüksü meyveler fenolik yapılar yönünden zengin olmaları nedeniyle bu çalışmalarda önemli yer tutmaktadırlar [3, 4]. Nitekim mevcut çalışmalar fenolik yapıların antikarsinojen, antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel, ve antiaterosklerotik gibi birçok etkilerinin olduğunu da göstermektedir [2, 5-8].

Fenolik bir yapı olan ellagik asit (EA) birçok bitki türünde doğal olarak sentezlenen bir bileşiktir. Bitkilerde hidrolizlenebilir formu olan ellagitannin (ET) şeklinde bulunan bu bileşik, bitki hücre duvarı ve hücre membran yapısında da yer almaktadır. ET'nin hidrolizi sonucunda oluşan EA, özellikle üzüksü meyvelerden çilek, kiraz, ahududu, kuşburnu türlerinde yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Öte yandan yabanmersini, boysen üzümü ve böğürtlende de yüksek oranda ET ve EA türevleri bulunmaktadır. Bunun dışında şarap ve meyve bazlı içecekler de EA ve türevlerini önemli miktarda barındırmaktadır.

EA'nın kimyasal özelliklerine bakıldığında hidroksil grupları sayesinde güçlü bir antioksidan etkisinin olduğu belirtilmiştir. Bu etkisi sayesinde hücresel antioksidanları aktive ederek oksidatif stresin hasarını ortadan kaldırmakta, diğer yandan oksidatif stresle ilişkili genleri baskılayarak reaktif oksidan türlerinin oluşumunu engellemektedir [9, 10]. Bunun yanında kansere yol açan çevresel toksinlere doğrudan etki ederek kanserin başlama fazını engelleyebildiği gibi, kanserojen ajanların DNA'ya bağlanmasını önleyerek kanser proliferasyonunu da baskılamaktadır [11, 12].

Kalpte gerçekleşen iyonik ve elektriksel temeller kalbin tüm fizyolojisini belirlemektedir. Kalpte bu iyonik ve elektriksel bütünlüğün bozulması ciddi kardiyovasküler hastalıklara yol açmaktadır. Bu nedenle iyonik ve elektriksel homeostazis oldukça önem arz etmektedir. Son yıllarda çeşitli kalp hastalığı

modellerinde yapılan çalışmalarda EA'nın kardiyoprotektif etkisinin de olduğu ileri sürülmüştür. Ellagik asidin isoproterenol (ISO) indüklenmiş aritmileri düzelttiği, hipertrofiyi baskıladığı, kasılmada yer alan proteinlerin fosforilasyonunu değiştirdiği ve lipid peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir [13-15]. Ancak EA'nın kalbin kasılma kuvvetini etkileyen iyonik mekanizmaları ve bu iyonik mekanizmaların altında yer alan moleküler yolları nasıl etkileyebileceği hala aydınlatılması gereken bir soru olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle, ventrikül miyositlerinde hem elektriksel uyarının, hem de mekanik aktivitenin düzenlenmesinde başat rol oynayan Ca^{2+} kanallarına EA'nın etkisinin açıklığa kavuşturulması bu bağlamda büyük önem arz etmektedir. Bu bilgilerden hareketle EA'nın kalbin uyarılma-kasılma çiftlenimine etkisinin mekanizmalarıyla birlikte geniş bir şekilde ortaya konulması, diyetle alınan bu yapıların kalp üzerine etkisinin anlaşılmasını, dolayısıyla tedavi edici potansiyelinin doğru bir şekilde değerlendirilmesini sağlayacaktır. Bu nedenle çalışmamızın amacı, EA'nın kalbin kontraktilesi ve Ca^{2+} akımlarına etkisini belirlemek ve oluşacak değişimlerin hangi yollar üzerinden gerçekleştiğini aydınlatmaya çalışmaktır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Polifenoller ve Genel Özellikleri

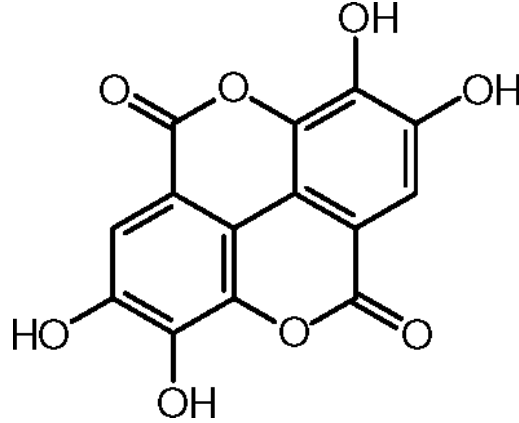
Dünyada ve ülkemizde kardiyovasküler hastalıkların görülme sıklığının hızla arttığı ve bu hastalıklara bağlı ölümlerin genel ölüm nedenleri içerisindeki payının ciddi şekilde yükseldiği bildirilmiştir[16]. Bu nedenle, kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek, özellikle de bitki orijinli, terapötik ajanlar konusunda son yıllarda pek çok araştırma yürütülmektedir. Sağlıklı beslenme ve bu olguya bağlı olarak fonksiyonel gıdalarda bulunan ve özellikle antioksidan özellik gösteren bileşikler hakkındaki araştırma ve uygulamaların sayısı artmakta ve konu gittikçe güncellik kazanmaktadır. Bu bağlamda, fonksiyonel gıdalar olarak bilinen tıbbi önemi ve etkileri kanıtlanmış olan ve organik gıda ürünlerinin doğal yapısında yer alan bileşikler olmaları nedeniyle polifenoller özellikle dikkat çekmektedir. Fenolik bileşiklerin insan sağlığı üzerine olan olumlu etkileri yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen bulgularla da desteklenmektedir. Nitekim mevcut çalışmalar bu yapıların antikarsinojen, antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel, ve antiaterosklerotik gibi birçok yararlı etkilerinin olduğunu göstermektedir [2, 5-8].

Fenolik bileşikler veya daha yaygın olarak kullanılan ismi ile polifenoller “benzen” halkası içeren, bitki orijinli yapılardır (Şekil 2.1). Bitkilerde bolca bulunan bu bileşikler sahip oldukları kimyasal yapıları sayesinde diğer bileşiklerle kolaylıkla etkileşime girebilmektedirler [1]. Fenolik fitokimyasalların bu özellikleri nedeniyle çok geniş biyolojik etkilere sahip olduğu ileri sürülmektedir. Oksidatif stres artışıyla ilişkili hastalıklara karşı koruyuculuk özelliği göstermeleri en iyi bilinen etkilerinin başında yer almaktadır [9, 10]. Bu etkilerini, biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikalleri ortadan kaldırmak suretiyle gerçekleştirmektedirler. Bilindiği gibi serbest radikaller hücrenin yapıtaşları olan nükleik asitleri, proteinleri ve lipidleri oksidatif hasara uğratmaktadırlar [17, 18]. Biyolojik makromoleküllerin oksidasyonu da pek çok fizyolojik sürecin aksamasına neden olmakta; böylece birçok hastalığın oluşumuna yol açmaktadır. Fenolik fitokimyasalların antioksidan özelliğinin sahip oldukları fenolik halka yapıları ve barındırdıkları hidroksil gruplarıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Böylece bu yapıları sayesinde oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterdikleri gibi, çeşitli faktörlere bağlı olarak gelişen oksidatif stresin yol açtığı hasarı azaltabilmektedirler [19].

Fenolik fitokimyasalların bilinen diğer önemli bir özelliği de, hücrenin fizyolojik süreçlerini hem biyokimyasal, hem de moleküler seviyede modüle edebilmeleridir. Çeşitli uyarıcılar veya sinyal molekülleriyle (DNA topoizomeras gibi) yapısal benzerlikleri sayesinde çok sayıda metabolik ve fizyolojik yolağı uyarma/baskılama yeteneğine sahip oldukları ileri sürülmektedir. Bu özellikleri

sayesinde gen ekspresyonunun uyarılması/baskılanması, protein aktivasyonu, enzim ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu/baskılanması gibi çok önemli fizyolojik süreçlere aracılık etmektedirler [20]. Ayrıca, karakteristik özellikleri (büyüklük, ağırlık, hidrofobiklik) ile biyolojik pH'ı düzenlemekte ve hücrel homeostazisin sürdürülmesinde önemli derecede katkı sağlamaktadırlar [21-23]. Bazı çalışmalarda fenolik fitokimyasalların anti-karsinojen etkilerinin olduğu gösterilmiştir [21]. Bu yapıların çeşitli yolları etkileyerek malignan tümör oluşumunu tetiklediği, karsinojenleri inaktive ettiği ve mutant genlerin ekspresyonlarını baskıladığı bildirilmiştir [24]. Bu yapılar ayrıca pro-karsinojenlerin aktivasyonunu sağlayan bazı enzimlerin (sitokrom P450 vb.) aktivitelerini baskılamaktadırlar [23, 25]. Anti-karsinojen özellikleri benzer şekilde mutagenlerin karakterizasyonunda kullanılan Ames testi ile de gösterilmiştir [22, 23].

Fenolik fitokimyasalların bilinen diğer bir özelliği de kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyuculuk özelliği taşımalarıdır. Nitekim şarap tüketimi yüksek toplumlarda kardiyovasküler hastalıkların görülme sıklığının düşük olduğu bilinmektedir. Hatta bu olguya ironik olarak "Fransız paradoksu" denilmektedir [26]. Fenolikler, platelet agregasyonunu baskılayarak ve LDL oksidasyonunu inhibe ederek kardiyovasküler hastalıkların oluşumunu engellemektedirler [27]. Bu yapıların ayrıca kan basıncını düzenleyerek anti-hipertansif, anti-trombotik ve anti-enflamatuvar etkilerinin de olduğu bildirilmiştir [28, 29].



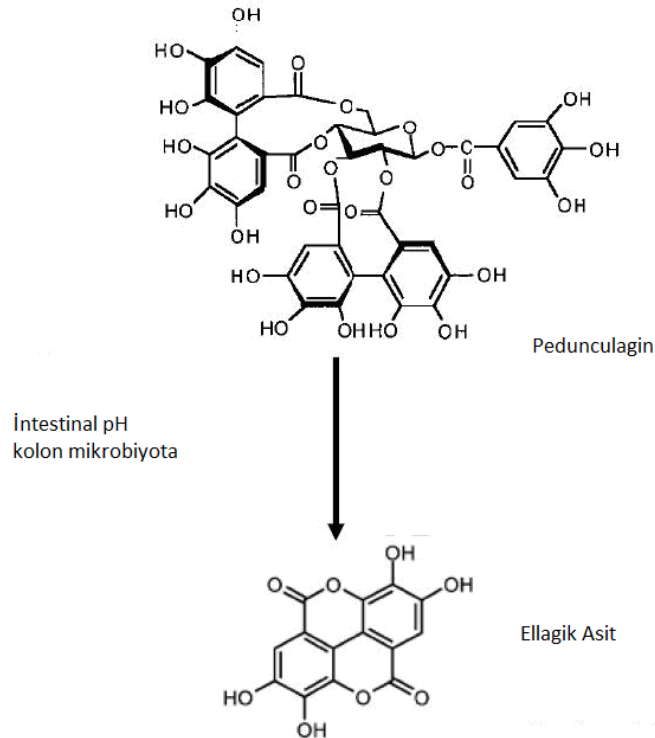
Şekil 2.1. Ellagik asidin moleküler yapısı. Ellagik asit laktonik bir bileşik olup 4 hidroksil grubu içermektedir.

Fenolik bileşiklerin diyabetin yol açtığı komplikasyonlarda da etkili olduğu düşünülmektedir [30]. Diyabet hastalarında yemek sonrasında kan glukoz değerini temsil eden postprandiyal değeri etkilemektedirler. Öyle ki, bu yapılar yemekten sonra kan glukoz seviyesinde postprandial artışa neden olan α -amilaz ve α -glukoronidaz enzimlerini inhibe ederek bu değeri düşürmekte ve böylece tip-2

diyabette de güçlü bir tedavi edici potansiyele sahip olduklarını göstermektedirler [31].

2.2. Ellagitaninler ve Ellagik Asit

Tanin terimi bitkilerde sekonder metabolit adı verilen ve sayısız fonksiyonlara sahip olan yapılar için kullanılmaktadır [32, 33]. Bu yapılar bitkileri haşerelerden ve dış etkenlerden koruyabildiği gibi bazı metabolik süreçlere de aracılık etmektedirler. Bitkilerde bulunan taninler suda çözünebilir fenolik bileşiklerdir. Bu yapılar $FeCl_3$ (demir-3-klorür) ile reaksiyona girdiklerinde mavi bir renk oluşumu gözlenmesiyle karakterize edilirler [34]. Taninler; yaygın bir kabule göre hidrolizlenebilir taninler ve kondanse taninler olarak 2 ana gruba ayrılmaktadır [35, 36]. Örneğin; sıcak su, asit, baz ve tannaz (taninleri sindirime uğratan enzim) gibi yapılarla sindirime uğrayan taninler hidrolize olabilen taninler sınıfına girmektedir. Hidrolizlenmeyen polimerik ve oligomerik taninler ise kondanse taninler sınıfına girmektedirler [1]. Kondanse taninlere diyetle daha sık rastlanmakta ve sağlık açısından önemli olduklarının düşünülmesi nedeniyle oluşumları, metabolizmaları gibi süreçler hakkındaki araştırmalar çoğalmakta ve literatür bilgisi gün geçtikçe artmaktadır [33]. Taninler içerdikleri yeterli sayıdaki hidroksil grupları sayesinde proteinlerle çapraz bağlar oluşturabilmektedirler. Bu çapraz bağlanma sayesinde pek çok gıdanın da tat açısından zenginleşmesine yardımcı olurlar [37]. Taninler ayrıca gıda işleme sektöründe, meyvelerin olgunlaştırılmasında çay ve kahve gibi içeceklerin fabrikasyonunda da önemli yer tutmaktadırlar [1].



Şekil 2.2. Ellagitaninlerin Ellagik aside dönüşmesi. Ellagitaninler fizyolojik ortamda kararlı bir duruma sahip değildirler. Bu nedenle fizyolojik pH ve/veya intestinal mikrobiyota tarafından daha kararlı yapıları olan ellagik asit formuna dönüştürülürler.

Son zamanlarda tıbbi önemi oldukça fazla olan hidrolizlenebilir taninler hakkında da çalışmalar artmakta ve bu yapıların oluşumu, günlük alımı, metabolizması gibi konular aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Hidrolizlenebilir taninlerde kendi içinde gallotaninler ve ET'ler olarak ikiye ayrılmaktadır. Gallotaninlere göre ET'ler doğada daha bol bulunmaktadır ve bugüne kadar 500 civarında doğal ET ürününün karakterize edildiği bildirilmiştir [1, 33, 35].

Ellagitaninler bir ya da daha fazla hegzahidroksi-difenol (HHDP) grubuyla karakterize olan ve genellikle glukoz ile esterefiye olan kompleks bir polifenol sınıfıdır [38]. Ellagitanin bileşikler HHDP'lerin ve glukoz gruplarının çok sayıda bağlanma olasılığı ve özellikle fenollerin dimerik ve oligomerik yapıya dönüşebilme eğilimlerinden dolayı geniş bir yapısal çeşitliliğe sahiptirler [35, 39]. ET'ler doğada ve fizyolojik koşullarda kararsız durumda olup, genellikle hidroliz ve polimerizasyon reaksiyonlarına uğrayarak suda EA gibi kolayca hidrolizlenmeyen yapılara dönüşürler (Şekil 2.2). ET'lerin asit, baz gibi maddelerle hidrolizi sonucu da HHDP'ler spontan olarak suda daha az çözünen EA'ya dönüşürler [40].

Bitkiler sayısız EA türevi barındırırlar. Çünkü bu yapılar metilasyon, glikozilasyon ve metoksilasyon gibi modifikasyonlarla sayısız türeve dönüşebilmektedirler [41]. Bu yapıların çözünürlüğü, mobilitesi, reaktivitesi de bu çeşitliliğe katkı sağlamaktadır. Bunun yanında hayvanlarda bulunan doğal mikrobiyota da bu çeşitliliği arttıran etmenlerden biridir. Sonuç olarak, hem bitkiler hem de hayvanlar sayısız EA türevi barındırmaktadır.

2.3. Ellagik Asit ve Ellagitanin Bitkisel Kaynakları

Ellagik asit, ET'lerin hidrolitik reaksiyonlar sonucu daha az polar özellik taşıyan bir üründür [42]. Son zamanlarda ET'lerin olduğu kadar EA'ların da gıdalardaki içeriğinin belirlenmesi önem kazanmaktadır. Ellagik Asit ve ET'ler meyvelerde, tohumlarda, sebzelerde, meyve bazlı içeceklerde, reçel ve marmelat gibi pek çok yapı ve bitkisel gıda içerisinde bulunmaktadır (Tablo 2.1). Farklı çalışmalar bitkilerde EA içeriğinin türe, meyvenin olgunluğuna, coğrafik orijinine, iklime ve diğer çevresel etmenlere bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir [43]. Özellikle üzüm meyveler familyasından çilek, kiraz, ahududu, kuşburnu türlerinde yüksek konsantrasyonda EA türevleri bulunmaktadır. Öte yandan yabanmersini, çay üzümü ve böğürtlen de yüksek oranda ET ve EA türevleri bulunmaktadır [44].

Üzüm meyvelerde serbest EA miktarının toplam EA muhteviyatının yüzde 40-50'si kadar olduğu gösterilmiştir [43, 45]. Kırmızı ahududunda toplam EA miktarı 47 mg/g iken, siyah ahududu türünde bu oran 90 mg/g değerindedir. Misket üzümü kültürlerinde yapılan analizlerde ise serbest EA içeriğinin 49.7 mg/kg olduğu bildirilmiştir [46]. Buna karşılık fındık ve cevizde bulunan toplam EA miktarı; sırasıyla kuru ağırlık olarak 0.59 mg/kg ve 0.33 mg/kg'dır [47]. Bushman ve arkadaşları [48] bazı bitki tohumlarında bulunan EA miktarlarını da belirlemişlerdir. Kırmızı ve siyah ahududu tohumlarında sırasıyla 8.7 mg/g ve 6.7 mg/g EA olduğu tespit edilmiştir. Ahududu kültürlerinden elde edilen tohumlarda 30 mg/g, maryon ahududu kültüründe 32 mg/g, çamyemişli ahududu kültüründe ise 21 mg/g olduğu bildirilmiştir. Bunun dışında muşmula bitkisinde ve mango kernel bitkisinde sırasıyla 1.6 mg/g ve 1.2 mg/g EA olduğu gösterilmiştir [49].

Tablo 1. Bazı bitki türlerinde bulunan EA miktarları. * mg/100g, **mg/L.

Bitki	EA miktarı	Referans
Çilek	1.77*	[50]
Ahududu	5.37*	[50]
Böğürtlen	3.69*	[38]
Nar	1.73*	[50]
Mum ağacı	0.18*	[50]
Ahududu reçeli	2.25*	[51]
Ananas	0.08*	[51]
Çilek reçeli	2.01*	[50]
Nar suyu	66.87**	[51]
Ahududu suyu	28**	[51]

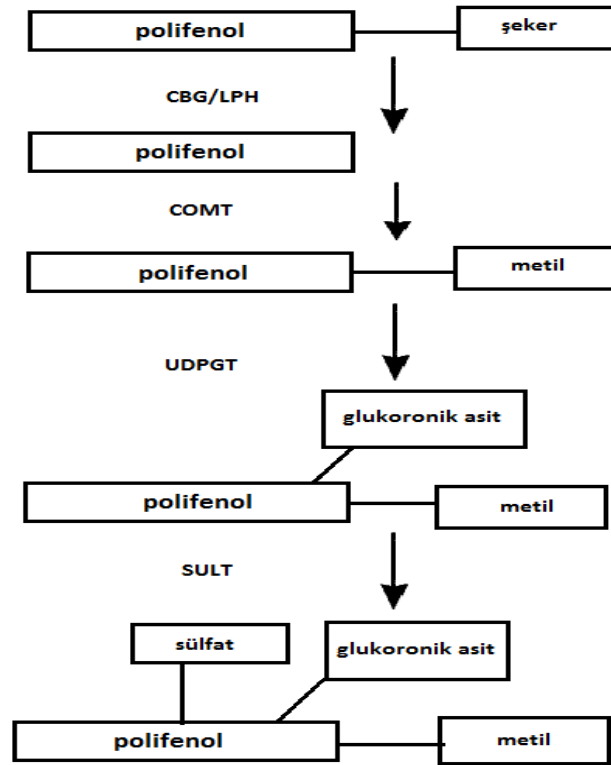
ET ve EA şarapta da bulunmaktadır [52]. Meşe odunundan yapılan fiçılarda şarabın yıllanması sırasında, ET ve türevleri fiçıdan sıvı ortama ekstrakte olabilmekte, sonradan çeşitli kimyasal reaksiyonlar sonucu yeni EA türevlerine dönüşebilmektedir [42]. Özellikle vescalagin ve kastalaginın fiçıdan şaraba en fazla ekstrakte olan ET'ler olduğu bildirilmiştir [42].

EA konsantrasyonunun en az olduğu bitkiler ise elma, portakal, mandalina, şeftali, armut, kivi ve yer fıstığı gibi yapılardır. Bu yapılarda EA konsantrasyonunun HPLC sistemiyle tespit edilebilen seviyenin altında olduğu gösterilmiştir [33].

2.4. ET ve EA Metabolizması

Gıda içeriğindeki ET ve EA gibi polifenollerin miktarının tam olarak bilinmemesi bu yapıların günlük alımı ile ilgili kesin bir kanaate varmayı zorlaştırmaktadır. Ancak günlük polifenol alımının dünya genelinde ortalama 1 mg/gün olduğu bildirilmiştir [42, 53]. Bu oran günlük vitamin C alınımından 10 kat, karotenoid ve vitamin E alınımından ise 100 kat daha fazladır.

Avrupa toplumunun diyetinde EA alımı genellikle kırmızı meyveler (çilek, ahududu gibi) aracılığıyla gerçekleşmektedir. Fransa'da yıllık ortalama bir birey 1.7 kg çilek ve çilek türevleri (şurup, tatlandırıcı gibi) tüketmektedir [42]. Bu da günlük olarak sadece çilek ve türevlerinden ortalama 0.2-0.3 mg EA alımına eşdeğerdir. Öte yandan yıllık kişi başına 60 litre şarap tüketimi düşen Fransızlar şarap aracılığıyla da yüksek miktarda EA almaktadırlar. Alman toplumunda EA alımının yaklaşık olarak 4.5 mg/gün olduğu hesaplanmıştır. Bunun yanında, Finlandiya'da yaklaşık 5.4 mg/gün, Avusturya'da 12 mg/gün, Hollanda'da 28 mg/gün, İspanya'da ise 2.6 mg/gün EA ve EA türevi tüketildiği bildirilmiştir [54, 55]. Ülkemizde ise bu oranın 26 mg/gün olarak gerçekleştiği iddia edilmemektedir.

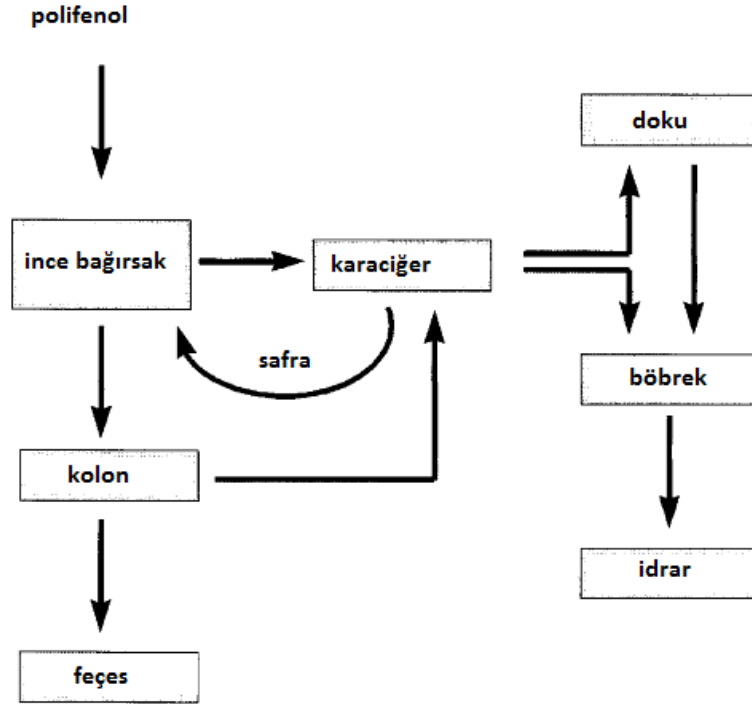


Şekil 2. 3. Polifenollerin sindirimi ve emiliminin temel basamakları. Polifenol metabolizması ilk olarak glikosidazlar aracılığıyla şekerlerin uzaklaştırılmasıyla başlar. Şeker gruplarının uzaklaştırılmasıyla birlikte polifenollerin absorpsiyondan sonra dolaşıma katılmaları için de konjuge formda olmaları gerekir. Genellikle bu işlem katekol-O metiltransferaz (COMT) enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. Konjugasyon farklı hidroksil gruplarının metilasyonunu sağlayarak bu yapıların farklı dokular tarafından tanınmasını kolaylaştırır. Bu işlem ise UDP glukuronosil transferaz (UDPGT) tarafından gerçekleştirilir. Polifenol metabolizmasının son basamağı sulfonizasyon basamağıdır. Sulfonizasyon işlemi sulfotransferazlar (SULT) ile gerçekleştirilir. CBG (sitozolik β glikosidaz), LPH (laktaz florazin hidrolaz), COMT (katekol-O-metiltransferaz), UDPGT (UDP glukuronosil transferaz).

Polifenollerin absorpsiyonu ve metabolizması ile kronik hastalıkların (kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi) insidansı arasında negatif bir korelasyon olduğu ve sebze/meyve ağırlıklı beslenen toplumların kanser insidansının düşük seyrettiği

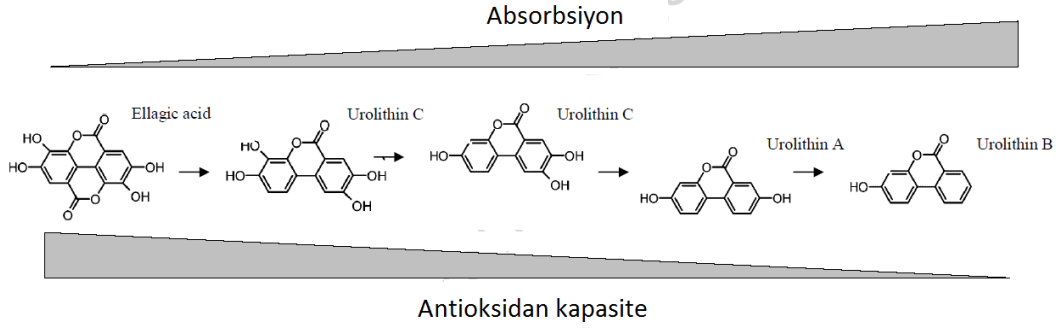
bildirilmiştir[56]. Çünkü polifenollerin alımıyla birlikte antioksidan potansiyelin artması sonucunda biyolojik sistemde bu hastalıklara karşı koruyucu bir mekanizma oluşmaktadır. Ancak, polifenollerin yapısal çeşitliliği antioksidan potansiyelini etkileyebilmekte ve çok az bir kısmı metabolizmada etkisini gösterebilmektedir. Bu nedenle EA gibi güçlü bir antioksidan özellik barındıran polifenollerin absorpsiyonu ve metabolizmasının aydınlatılması oldukça önem taşımaktadır.

İlk yapılan çalışmalarda sıçan bağırsak içeriğindeki ET'lerin ince bağırsak ve çekumdaki pH'tan etkilenerek EA'lara dönüşebileceği gösterilmiştir. Çekumdaki mikrobiyotanın da bu dönüşümde rol aldığı iddia edilmektedir. Yüksek dozda ET verilen sıçanların idrar ve dışkı örneklerinde metabolit olarak EA'nın bulunduğu gösterilmiştir [57]. Yüksek dozlarda (600 mg/kg) EA verilen farelerde ise bu yapıların reabsorpsiyon hızının %28 oranında olduğu tespit edilmiştir [58]. Böylece plazmada EA'lara rastlanması ET'lerin fizyolojik pH ve bağırsak mikrobiyotası tarafından EA'lara dönüştürüldüğü fikrini güçlendirmektedir. Gonzalez ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda EA'ların ileal sıvıda %241 geri kazanımının olduğunu göstermişlerdir. Bu da ET'lerin midede ve ince bağırsakta EA'ya dönüşebileceğini nitelemektedir [59].



Şekil 2.4. Polifenollerin absorpsiyonu metabolizması ve atılımı. Polifenoller eğer midede veya bağırsaklarda sindirime veya emilime uğramazsa ya kolondan dışarı atılır, ya da kolondaki mikrobiyota yardımıyla metabolize olup karaciğere gönderilir. Öte yandan, ince bağırsakta emilen polifenoller karaciğere gelerek konjugasyona uğrar buradan da dokulara, enterohepatik sisteme veya böbreğe iletilirler.

Ellagitanin ve EA türevlerinin ince bağırsaktaki sindirimine bakıldığında bu yapıların temel olarak lakton zincirini kırılması, dekarboksilasyon ve dehidroksilasyon reaksiyonları sonucu dibenzopyranonlar (3,8-dihydroxy-6H-dibenzopyran-6-one) olarak bilinen urolitin A ve onun monohidroksilasyona uğramış formu olan urolitin B 'ye dönüştüğü bildirilmektedir [60]. ET ve EA'nın urolitinlere dönüşmesi emilimini kolaylaştırırken antioksidan potansiyelini düşürmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Ellagik asit türevlerinin absorpsiyonu . Polifenollerin sahip oldukları hidroksil grupları antioksidan kapasitesini artırırken absorpsiyonunu azaltmaktadır.

Ellagik asit türevlerine safra sıvısında da rastlanmakta ve bu da onların enterohepatik sirkülasyona uğradıklarını göstermektedir. Bu durum, ayrıca bu yapıların sindirimine midede başlayabileceğini de düşündürmektedir [61]. Öte yandan bu yapıların maksimum 56 saat sonra karaciğerde konjuge halde karaciğerde varlığı gösterilmiş ve bu da bu yapıların dolaşıma katılarak hedef organlara gidebileceği kanaatine varılmıştır (Şekil 2.4). Öte yandan nar suyu verilen insanların kan plazmasında da 31.9 ng/ml EA tespit edildiği bildirilmiştir.

2.5. Ellagik Asidin Biyolojik Fonksiyonları

Bitkisel olarak üretilen EA gibi fenolik bileşiklerin sağlık açısından çok önemli oldukları ve insan sağlığı için yararlı etkileri olduğu ileri sürülmektedir [62]. Özellikle EA'nın bu olumlu etkileri pek çok mekanizmayı etkileyerek, farklı yollardan gerçekleştirdiği iddia edilmektedir. Ellagik asit antioksidan enzimlerin hem sentezini artırarak, hem de aktivasyonunu hızlandırarak oksidatif stresin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmaktadır. Öte yandan karsinojenleri yok ederek antikarsinojen etki gösterdiği de bildirilmiştir. Ellagik asidin ayrıca kardiyoprotektif etkilerinin olduğu da düşünülmektedir.

2.5.1. Antioksidan etkileri

Sağlıksız gıdalar ile beslenme ve bazı çevresel faktörler insan vücudunda hücrelerin yaşlanmasına, kanserli hücrelerin artmasına ve hücre mutasyonlarına neden olan serbest oksijen radikallerinin oluşumunu hızlandırmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin engellenmesinde üzümü meyvelerin yüksek oranda etkili olduğu belirtilmektedir. Özellikle ahududu ile böğürtlenlerdeki antosiyanin pigmentinin yoğunluğu ve polifenol içeriğinin fazla olması bu meyvelere bir

antioksidan aktivite kazandırmaktadır [20, 44]. Ahududu ve böğürtlenlerden her gün bir kase tüketmenin, yüksek oranda antioksidan alımına neden olduğu ve söz konusu hastalıklara karşı vücudu koruyabileceği ileri sürülmektedir [33].

Tablo 2. Bazı meyve türlerinde EA ve antosiyanin miktarına bağlı gözlenen ORAK(Oksijen Radikalleri Absorbans Kapasitesi) değerleri

Meyve türü	ORAK <i>umol TE/g</i>	Antosiyanin (mg/100g)	EA (mg/100g)
<i>Siyah ahududu</i>	168-190	214-589	5.37
<i>Böğürtlen</i>	58-100	83-326	3.69
<i>Morion üzümü</i>	46-90	109-155	5.83
<i>Boysen üzümü</i>	35-85	120-160	3.58
<i>Kırmızı ahududu</i>	27-50	20-65	3.39
<i>Çilek</i>	26	40	0.69-1.6
<i>Portakal</i>	8-37	-	-
<i>Vişne</i>	21	-	-
<i>Elma</i>	3-10	1-10	-
<i>Yeşil üzüm</i>	8-13	5	-

Bitkilerin ve gıdaların antioksidan potansiyelini gösteren bir test olan Oksijen Radikalleri Absorbans Kapasitesi (ORAK)'ne bakıldığında üzümü meyvelerin ORAK değerlerinin oldukça yüksek olduğu ve bu değer EA içeriğiyle büyük oranda uyumlu olduğu gösterilmiştir (Tablo 2).

Ellagik asidin güçlü bir anti-radikal aktivitesinin olduğu bilinmektedir. Ellagik asidin bu özelliği yapısında bulunan hidroksil gruplarının sayısı, pozisyonu ve şeker gruplarıyla karakterize edilmektedir. Genel olarak yüksek molekül ağırlığına sahip polifenoller daha güçlü bir antioksidan kapasiteye sahiptir. Ellagik asidin düşük molekül ağırlığına rağmen güçlü bir antioksidan olması hidroksil gruplarının fazla olması, orto pozisyonunda hidroksil grup barındırması ve şeker esterlerinin olmamasından ileri gelmektedir [63].

Ellagik asit aktivatör protein (AP1), nükleer faktör kapa B (NF-kB) ve c-fos gibi transkripsiyon faktörlerini uyararak antioksidan enzimlerin (GSH, SOD/CAT, GST gibi) ekspresyonlarını artırmanın yanında, SOD, CAT, NADPH oksidoredüktaz gibi birçok antioksidan enzimin aktivitesini yükselterek oksidatif

stresi baskılamaktadır[64]. Prokarsinojenler olarak da bilinen sitokrom-P450 ailesine etki ederek ve mitokondriyal aktiviteyi düşürerek reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oluşmasını engellemektedir [65]. Ellagik asidin karbon tetra-klorür verilen sıçanların karaciğerinde antioksidan enzimleri aktive ederek hepatoprotektif etkiler gösterdiği bildirilmiştir [66]. Ayrıca böbrekte antioksidan sistem aracılığıyla Cisplatin indüklü oluşan nefrotoksisiteyi düzelttiği bildirilmiştir [67]. Pulmoner disfonksiyonlara neden olan siklofosfamidinin sıçan ciğerinde oksidan hasara yol açtığı EA uygulamasının ise bu hasarı düzelttiği rapor edilmiştir [68]. Öte yandan beyin ve sinir dokularında oluşan oksidan stresin de EA uygulamasıyla birlikte azaldığı bildirilmiştir [69]. Ellagik asidin kalpte GSH, SOD, CAT aktivitesini artırdığı; ROS, tiobarbutik asit reaktif türleri (TBARS) ve ksantin oksidaz (KO) seviyesini ise düşürdüğü de bildirilmiştir [70, 71].

2.5.2. Antiokarsinojen etkileri

Ellagik asit çevresel toksinlerin metabolizmasına etki ederek karsinojenez sürecine etki etmektedir. EA bu etkisini toksin birikimini ve oluşumunu engelleyerek gerçekleştirmektedir [9]. Ayrıca karsinogenlerin DNA'ya direkt bağlanmasını engelleyerek antimutajenik etki göstermektedir [58]. Öte yandan ksenobiyotik metabolizmasının enzimlerini inhibe edebilmektedir [9]. Ellagik asidin oral yolla alınan karbon tetraklorüre karşı hepatoprotektif bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [66]. Sıçan kemik iliğinde kromozomal aberasyonları alfa-tokoferol kadar azalttığı [72], lenfositlerinde de radyasyon indüklü DNA zinciri kırılmalarını tamir ettiği bildirilmiştir [73]. Tümör dokuda G1 arrestini indüklediği, hücre büyümesini baskıladı ve hücreleri apoptozise uğrattığı gösterilmiştir [74].

EA'nın, DNA'da oksidatif hasarın büyük bir bölümünü engelleyerek kanser gelişmesini büyük ölçüde durdurduğu yönündeki bilgiler gün geçtikçe artmaktadır [12, 75]. EA'nın kanser oluşumuna aracılık eden hasarlı DNA topoizomerazların güçlü bir inhibitörü olduğu iddia edilmektedir [76]. Yapı-fonksiyon aktivite çalışmaları EA'nın sahip olduğu 3,3'-hidroksil grubu ve lakton yapısıyla topoizomeraz inhibisyonunda güçlü bir fenolik yapı olabileceği gösterilmiştir [76]. Bazı çalışmalar EA'nın quersetinden daha güçlü bir kemoprotektif etkisinin olduğunu ortaya koymuştur [77]. Ayrıca, EA'nın kansere karşı koruyucu etkisinin vitamin E den daha iyi olduğu da bildirilmiştir [78].

2.5.3. Kardiyoprotektif etkileri

Fenolik bileşiklerin kalp üzerine olumlu etkilerine literatürde sıkça vurgu yapılmaktadır. Kardiyovasküler hastalıkların ve bu hastalıklara bağlı ölümlerin artması tedavi edici ajanlar konusundaki ilgiyi ve dolayısıyla bu yapıların önemini giderek arttırmaktadır. Bu yapılar kalpte hem bir koruma mekanizması sağlamakta, hem de hastalık durumunda güçlü bir tedavi edici ajan olarak görev almaktadır. Artan güncel bilgiler, mekanizmaları kesin olarak bilinmemekle birlikte, EA'nın kardiyoprotektif etkisinin olduğunu göstermektedir.

İsoproterenol uygulanan sıçanlarda gerçekleşen miyokardiyal enfaktüse bağlı olarak aritmilerin, kardiyak hipertrofinin geliştiği, miyoglobin seviyesinin ve lipid peroksidasyon profilinin arttığı görülmüş, EA verilen sıçanlarda ise ISO'nun tetiklediği aritmilerin azaldığı, ventriküler hipertrofinin ve lipid peroksidasyonun düzeldiği görülmüştür [14]. Bu bulgular EA'nın miyokardiyal enfarktüse karşı

koruyucu etkisinin olabileceğini göstermiştir. Yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda görülen metabolik sendromun kardiyovasküler yeniden yapılanmaya ve ventriküler fonksiyonların değişmesine yol açtığı bilinmektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada EA uygulamasının metabolik sendromda görülen bu değişimleri düzelttiği gösterilmiştir [79]. Ellagik asidin hem kasılmadan (troponin gibi) [13], hem de hücre içi Ca^{2+} düzenlenmesinden sorumlu proteinlere etki edebildiği de gösterilmiştir [80].

Ellagik asit vasküler hastalıklara karşı da koruyucu etki göstermektedir. Örneğin, membrandaki glikol konjugatlarının dejenerasyonu sonucu dolaşımda glikoprotein seviyesinin yükseldiği, bunun da dejeneratif vasküler hastalıkların oluşumuna neden olduğu bilinmektedir [81]. Ellagik asit verilen hayvanlarda serumdaki glikoprotein miktarının azaldığı gösterilmiştir. Bu özelliği sayesinde EA hem vasküler hastalıklara karşı koruyucu etki göstermekte, hem de membran stabilizasyonu açısından önemli bir fitobesin olarak karşımıza çıkmaktadır. Öte yandan hastalık durumunda serumda artan demir, ürik asit, kan glukozu değerleri ve azalan demir bağlama kapasitesini ve total serum protein miktarını düzeltmektedir. Serumda bu yapıların, serbest radikallerin artmasına bağlı olarak değiştiği ve EA'nın bu serbest radikalleri temizleyerek, bu sürecin düzelmesine aracılık ettiği ileri sürülmektedir [15]. Ateroskleroz, kronik inflamatuvar bir hastalık olarak bilinen ve diğer kardiyovasküler hastalıklarla da ilişkisi olan patofizyolojik bir durumdur. Okside düşük yoğunluklu lipoprotein (oxLDL) ve nitrik oksid (NO) miktarının ateroskleroz oluşumunda önemli etkileri olduğu bilinmektedir. oxLDL, proinflamatuvar ajanları ve apoptozisi indükleyerek ateroskleroz oluşumuna aracılık etmektedir. Öte yandan yüksek oranda NO peroksinitrit oluşumuna ve hücre toksisitesine neden olmaktadır. Ellagik asit NADP(H) oksidaz enzimini baskılayarak süperoksit oluşumunu azaltmakta ve benzer şekilde yüksek oranda NO oluşumuna aracılık eden iNOS'(indüklenabilir nitrik oksit sentaz)'u baskılayarak da NO oluşumunu engellemektedir [82]. Ellagik asit bu etkilerini PI3K/Akt/eNOS/NO yolağı aracılığıyla gerçekleştirmektedir [83, 84]. Bu yolağın pro-apoptotik yapı olan kazpaz-3 ün katalitik alt birimini S-nitrosilasyona uğratarak aktivitesini düşürdüğü bildirilmiştir [82, 83].

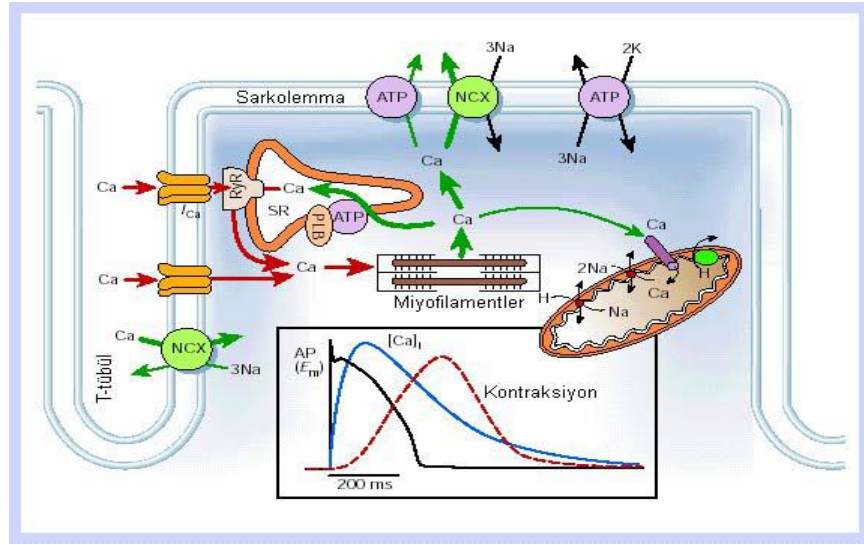
2.6. Kalp Kasının Yapısı

Vücudun tüm doku ve organlarına kan pompalayan kalp, göğüs boşluğunda yer alan fibröz bir kılıf olan perikardiyum ile sarmalanmış, kas yapısında bir organdır. Morfolojik açıdan bakıldığında kalp yaklaşık 12 cm uzunluğunda ve 9 cm genişliğindedir. Miyokardiyum da denilen kalbin duvarları temel olarak kardiyak-kas hücrelerinden oluşur. Miyokardiyumun kalp-kası hücreleri birbirine sıkıca bağlanmış tabakalar halinde düzenlenmiş olup, kanın bulunduğu odacıkları bütünüyle sarar. Bir odacığın duvarları kasıldığında sıkılmış bir yumruk gibi bir araya gelir ve çevreledikleri kana basınç uygularlar. Komşu hücreler interkale diskler denen yapılar aracılığı ile uç uca eklenirler. Bunların içinde hücreleri bir arada tutan ve miyofibrillerin de bağlandığı desmozomlar vardır. Kalpte uyarı sinoatriyal düğümünden başlar ve atriyoventriküler düğüm aracılığıyla ventriküllere iletilir daha sonra tüm kalbe yayılır. Uyarının iletimi gap junction denilen hücreler arası bağlantılar yoluyla gerçekleşir. Böylece iletim çok hızlı olarak tüm kalp boyunca yayılır ve kalbin senkronize bir şekilde uyarılmasını sağlar.

2.7. Kalpteki Elektrofizyolojik Olaylar

2.7.1. Kalpte Uyarılma-Kasılma Çiftlenimi

Kardiyak uyarılma-kasılma çiftlenimi elektriksel uyarılmadan miyositin kasılmasına kadar geçen olayları kapsamaktadır. Hücreler arası bağlantılar (gap junctions) sayesinde kasılma senkronize bir şekilde gerçekleşmektedir. Kalbin kasılması işlemi sinoatriyal hücrelerde başlar. Daha sonra tüm kalp hücrelerine yayılan aksiyon potansiyeliyle (AP) kalbin kasılmasını sağlayan süreçler dizisi tetiklenmiş olur. AP geçici depolarizasyon durumu olup intraselüler Ca^{2+} artışına neden olur. İntraselüler Ca^{2+} artışıyla birlikte Ca^{2+} troponin C'ye bağlanarak kasılma işlemi gerçekleşir [85].



Şekil 2.6. Ventrikül hücrelerinde hücre içi Ca düzenlenmesi. Alt grafik aksiyon potansiyeli, Ca tranziyeti ve kasılmanın zamansal değişimlerini göstermektedir. NCX, Na^+/Ca^{2+} değiş tokuşu; ATP, ATPaz; PLB, fosfolamban; SR, sarkoplazmik retikulum RyR, ryanodin reseptörü [85].

Kardiyak AP sırasında Ca^{2+} depolarizasyonla aktive olan L-tipi Ca^{2+} kanalları (LTCC) aracılığıyla hücre içine girmektedir. Ca^{2+} iyonunun hücre içine girişiyle birlikte sarkoplazmik retikulumdan (SR) ryanodin reseptörleri (RyR) aracılığıyla Ca^{2+} salınımı gerçekleşmektedir. Bu olay ilk olarak Fabiato ve arkadaşları tarafından gösterilmiş ve bu olaya kalsiyum indüklü kalsiyum salınımı (CICR) denilmiştir [86]. Kalsiyum indüklü kalsiyum salınımı uyarılma-kasılma çiftlenimini düzenleyen temel mekanizmadır. Gevşeme durumunda ise Ca^{2+} geri alınımında 4 mekanizma rol oynar. (1) sarko-endoplazmik retikulum Ca^{2+} ATPaz (SERCA), (2) NCX, (3) sarkolemmal Ca^{2+} ATPaz ve (4) mitokondriyal Ca^{2+} uniporter. Sarkolemmal Ca^{2+} ATPaz ve mitokondriyal Ca^{2+} uniporter'ların Ca^{2+} geri alınımında etkisi çok azdır [85]

Kalp AP'nin konfigürasyonu çeşitli fazlara bölünebilir. Şekil 2.7'de ventrikül hücresi AP'nin 5 fazı ve temel olarak her fazdan sorumlu olan akımlar görülmektedir. Faz 0 AP'nin sıçraması; faz 1 erken repolarizasyon evresi; faz 2 plato evresi; faz 3 asıl repolarizasyon fazı; ve faz 4 dinlenim potansiyeli evresidir.

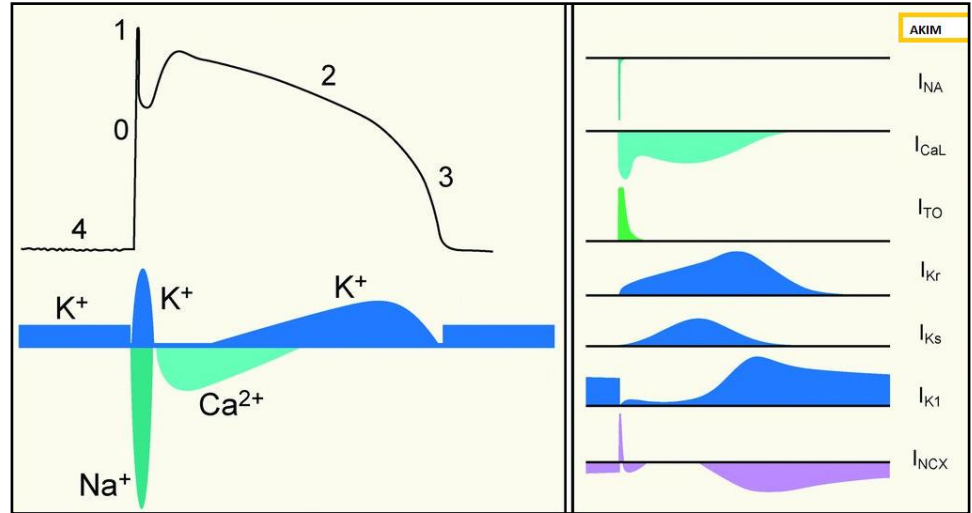
Faz 0: AP'nin Na^+ akımlarına bağlı olan hızlı sıçrama evresidir. Bu akımın hızlı aktivasyon ve inaktivasyon kinetikleri vardır. 1 ms'de tepe değerine ulaştıktan sonra kendiliğinden azalır (inaktivasyon). Ufak bir depolarizasyonla Na^+ kanalları açılmaya başladığında, elektrokimyasal gradyentten dolayı Na^+ hücre içine girmeye başlar.

Faz 1: AP'nin çıkışını hemen takip eden geçici ve bağıl olarak küçük repolarizasyon evresidir. Büyük oranda depolarizasyonla hızla açılan bir tip K^+ kanalının geçici dışarı doğru akımına (transient outward current; I_{to}) bağlıdır. Daha az olmakla birlikte klor (Cl^-) akımının da katkısı vardır.

Faz 2: Plato evresi olarak bilinen bu faz erken repolarizasyon fazını takip eden ve zar potansiyelinin görece sabit olduğu süreci kapsar. Kalp hücrelerinde görülen uzun AP'nin nedenidir. Platonun nedeni içeri doğru pozitif akımların dışarı doru pozitif akımları neredeyse dengelemesidir. L-tipi Ca^{2+} kanallarından içeri doğru Ca^{2+} girişine karşılık, yavaş aktive olan K^+ (gecikmiş doğrultucu akım; I_{K}) kanallarından K^+ dışarı çıkar. Buna ek olarak, I_{to} 'da platonun erken evresine katkıda bulunmaktadır.

Faz 3: Platoyu takip eden son repolarizasyon evresidir. İnaktivasyon nedeniyle I_{Ca} zamanla azalırken, yavaş aktive olan I_{K} artar ve baskın hale gelir. Bu akımın inaktivasyonu olmadığından uzun sürelidir.

Faz 4: Ventrikül hücrelerinde dördüncü faz dinlenme potansiyelidir. Zar K^+ iyonlarına yüksek geçirgenlik gösterdiğinden potasyum denge potansiyeline yakın bir değer almaktadır. Dinlenme potansiyeli büyük oranda içeri doğrultucu (I_{K1}) da denen bir tip K^+ akımı tarafından belirlenmektedir.



Şekil 2.7. Ventrikül aksiyon potansiyelinin evreleri ve onlara karşılık gelen iyon akımları [87].

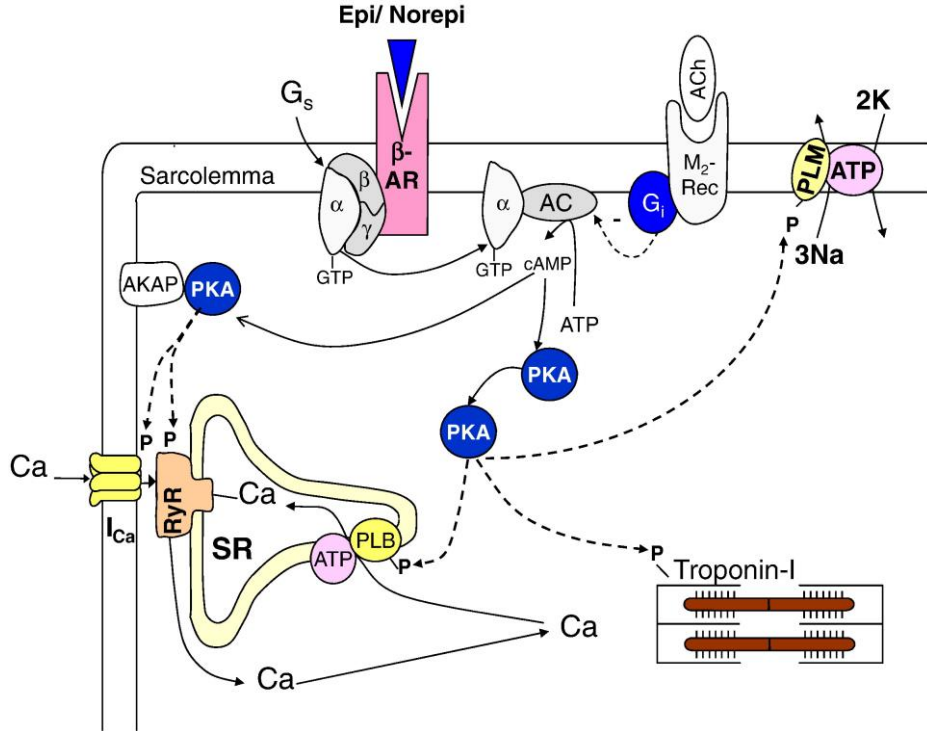
2.7.2. Miyokardiyal Ca²⁺ homeostazisinin düzenlenmesi

Ca²⁺ iyonu kardiyomiyositlerin kasılmasından gen düzenlenmesine kadar pekçok biyolojik aktiviteye sahip ikincil bir mesajcıdır. Hücre içi Ca²⁺ homeostazisinde meydana gelebilecek bozukluklar ciddi sonuçlara yol açmaktadır. Bu nedenle fizyolojik koşullarda kardiyak Ca²⁺ homeostazisi çeşitli sistemler tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir.

β-adrenerjik sistem

Ca²⁺ akımlarının β-adrenerjik agonistlerle aktivasyonu bilinen en temel mekanizmalardan biridir [88]. Bu etki doğrudan protein kinaz A (PKA) aracılığıyla gerçekleşmektedir. β-adrenerjik aktivasyon Ca²⁺ akımlarını 2-4 kat arttırmakta ve voltaj bağımlı aktivasyonu ve inaktivasyonu daha negatif potansiyellerle kaydırmaktadır. Böylece negatif potansiyellere kayma ile birlikte Ca²⁺ akımları bu potansiyellerde maksimal değere ulaşabilmektedir.

β-adrenerjik stimülasyon G proteinlerinin aktivasyonu ile başlar. Reseptöre ligand bağlandıktan sonra GTP bağlayıcı proteinden alfa alt birimi ayrılır ve adenilil siklazı (AS) aktive eder. Adenilat siklaz ATP'den cAMP sentezini katalizler. cAMP, cAMP bağımlı PKA'yı aktifleştirir. Protein kinaz A aktifleştikten sonra L-tipi Ca²⁺ kanalı ryanodin reseptörü fosfolamban ve troponini fosforilleyerek Ca²⁺ homeostazisine etki eder (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. β-adrenerjik aktivasyon. Fizyolojik koşullarda, reseptör-ligand etkileşiminden sonra AS aktive olur ve intraselüler ortamda cAMP oluşumu gerçekleşir. cAMP, PKA'yı aktifleştirir. PKA ise LTCC, RyR, SERCA2a, PLB, NCX ve kasılma proteinlerine etki ederek pozitif inotropik-kronotropik-lusitropik etkisini göstermektedir.

β -adrenerjik sistem Ca^{2+} akımlarını (I_{CaL}) nasıl etkilediği formülize edilerek de açıklanabilir. I ; Ca^{2+} akımı olmak üzere, N_f ; hücrede fonksiyonel kanal sayısı, p_o kanalın açık olma olasılığı, i ; tek kanal akımını temsil etmektedir. Buna göre;

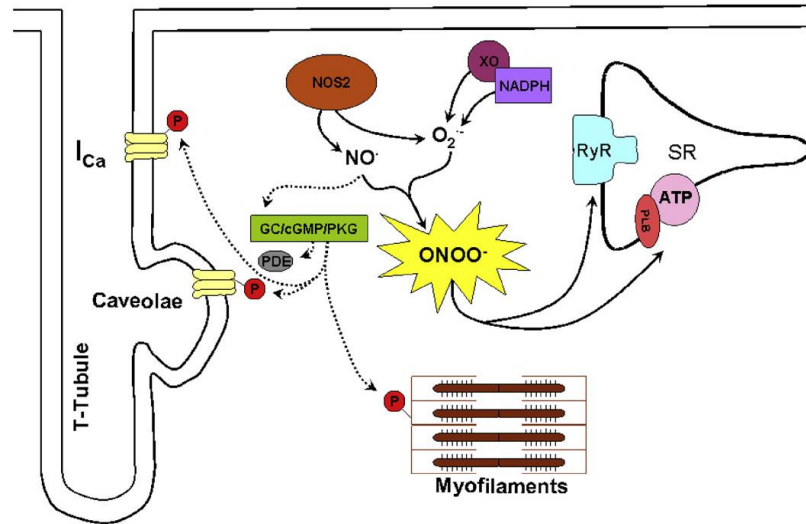
$$I = N_f \times p_o \times i$$

Tek kanal akım konduktansının değişmediği bilinmekte bu nedenle i sabit olarak kabul edilmektedir [89]. Kanalın açık olma olasılığı, p_o β agonist stimülasyonu ile artmaktadır [90]. Böylece normalde ilgili potansiyel değerinde fonksiyonel olmayan kanallar β adrenerjik stimülasyonla aktive olabilmektedir. Sonuçta hem N_f hem de p_o β -adrenerjik aktivasyonla arttığı için net akım da artmaktadır.

β -adrenerjik kaskad başka sinyal yollarıyla da birleşerek Ca^{2+} akımlarını modüle edebilmektedir. Örneğin; asetilkolin, tek başına bazal I_{CaL} değerlerine etki etmezken, katekolamin (epinefrin ya da norepinefrin) ya da forskolin (adenilil siklaz aktivatörü) aracılı artmış I_{CaL} değerlerini güçlü bir şekilde antogonize etmektedir. Asetilkolin bu etkiyi muskarinik reseptör aracılığıyla aktive olan G_i protein aktivasyonu ile gerçekleştirir. G_i protein aktivasyonu adenilat siklazın inhibe ederek cAMP oluşumunu engellemektedir. Ayrıca cGMP oluşumunu artırarak da cAMP'yi katalizleyen fosfodiesterazları aktifleştirmektedir (Şekil 2.8) [91].

Nitrik Oksit

Nitrik oksit L-argininden sitrullin oluşumu sırasında ortaya çıkan kısa ömürlü bir gazdır. NO molekülünün ilk olarak noronal iletimde ve kan damarlarının dilatasyonunda rol aldığı bildirilmiştir [92, 93]. Ancak güncel çalışmalar NO'nun da kalpte uyarılma kasılma çiftlenimini regüle eden mekanizmalardan biri olduğunu göstermektedir[94].



Şekil 2.9. NO'nun kalpteki iyonik mekanizmalarla ilişkisi. Fizyolojik ve patofizyolojik koşullarda NOS'un kardiyak homeostazise etkisi gösterilmektedir. NOS aracılığıyla oluşan NO I_{CaL} regülasyonunu ve kasılmadan sorumlu proteinleri (troponin gibi) fosforilasyona uğratmaktadır. Patofizyolojik koşullarda ise NO peroksinitrit oluşumuna neden olur böylece RyR ve PLB'e etki ederek $[Ca]_i$ homeostazisini bozmaktadır [95].

Nitrik oksit etkisini genel olarak cGMP bağımlı veya cGMP bağımsız olarak gerçekleştirmektedir [95]. cGMP bağımlı etkide NO guanilil siklaz(GS)'i aktive etmekte, böylece cGMP oluşmaktadır. cGMP, cGMP bağımlı protein kinaz G (PKG) ve cGMP bağımlı fosfodiesterazları (PDE2, PDE3 gibi) aktive ya da inhibe etmektedir. cGMP bağımsız etkiyi ise proteinleri S-nitrozilasyona uğratarak gerçekleştirmektedir. NO ayrıca direkt olarak AS'yi uyararak cAMP artışına yol açmakta böylece kontraktiletiyi etkilemektedir (Şekil 2.9.) [96].

Nitrik oksit kalpte nitrik oksit sentazın (NOS) 3 farklı izoformuyla sentezlenmektedir. Nöronal NOS (nNOS, NOS1) ve endotelial NOS (eNOS, NOS3) kalpte yoğun bir şekilde sentezlenmektedir. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz ise genellikle patofizyolojik durumlarda (iskemi-reperfüzyon hasarı, kalp yetmezliği gibi) sentezlenmektedir. NOS1 ve NOS3 kardiyak fonksiyonlarını farklı şekilde regüle etmektedir (Şekil 2.9.). NOS1 kuvvet-frekans cevabının (force-frequency response; kasılma ve gevşeme için) regülasyonunda etkilidir. Nitekim NOS1 knock-out farelerde kuvvet-frekans cevabının azaldığı görülmüştür [97]. Yapılan çalışmalarda NOS1 knock out farelerde β -adrenerjik cevabın da azalması bu yapının β -adrenerjik sistemle ilişkisinin olduğuna işaret etmektedir [98]. Öte yandan NOS3 gerim bağımlı $[Ca^{2+}]_i$ dinamikleri ve kardiyomiyosit kasılmasından sorumludur. NOS3 β -adrenerjik cevabı regüle etmektedir. Yapılan çalışmalar NOS3'ün aritmileri, hipertrofiyi ve fibrozis oluşumunu azalttığını göstermiş, bu da onun kardiyoprotektif bir rol üstlendiğini göstermektedir [99].

Diğer modülatörler

Bazı hormonların da kardiyak fizyolojiyi etkileyebildiği gösterilmiştir [100]. Atrial natriüretik peptidin (ANP) $[Ca^{2+}]_i$ azalttığı bilinmektedir. ANP asetilkolin gibi G_i aktivasyonuna neden olmakta böylece cAMP bağımlı $[Ca^{2+}]_i$ artışını engellenmektedir [101]. ANP ayrıca GS'yi aktive ederek cGMP üretimine de neden olmaktadır. cGMP artışıyla birlikte $[Ca^{2+}]_i$, PKG ve PDE'ler aracılığıyla modüle edilebilmektedir [102].

Adenozin P_1 purinerjik reseptörüne bağlanarak G_i aktivasyonuna yol açmakta, dolayısıyla da β adrenerjik aracılı $[Ca^{2+}]_i$ artışını engellemektedir [103]. Adenozinin P_2 -purinerjik reseptör aktivasyonu G_s aktivasyonuna ve böylece $[Ca^{2+}]_i$ artışına neden olmaktadır. Forbol esterlerinin de doğrudan PKC'yi etkileyebildiği, bu yüzden kalbin iyonik mekanizmalarını modüle ettiği ileri sürülmüştür. Ancak bu etki konusunda Ca^{2+} akımlarını arttırdığı [104], değiştirmedeği [105] veya azalttığı [106] yönünde çelişkili veriler bildirilmiştir. Angiotensin II'nin PKC aracılı $[Ca^{2+}]_i$ artışını PKA'dan daha etkin bir şekilde düzenlediği gösterilmiştir [106]. Protein tirozin kinaz inhibitörlerinin de $[Ca^{2+}]_i$ azalttığı bildirilmiştir [107].

MATERYAL VE METOD

3.1. Deney gruplarının oluşturulması

Çalışmada ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen, yaklaşık üç aylık, 60 adet Wistar türü erkek sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar, deney süresi boyunca her kafeste 4 tane olacak şekilde, su ve yem kısıtlaması olmaksızın tutulmuşlardır. Çalışmamız akut bir çalışma olduğundan gruplandırma hücre seviyesinde, uygulama öncesi ve sonrası olarak tasarlanmıştır. Öyle ki, EA verilmeden önceki hücreler kontrol grubu (KON) , EA verildikten sonra ise bu hücreler ellagik asit verilen grup (EA) olarak kabul edilmiştir.

3.2. Kardiyak Miyositlerin İzolasyonu

Deney gruplarında bulunan hayvanların kalpleri hafif anestezi altında (50 mg/kg sodyum pento barbital) hızlı bir şekilde çıkarıldıktan sonra Langendorff sistemine bağlanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Sıçan kalbi izolasyonunun temel basamakları. Sıçanlar anestezi verilerek bayıltıldıktan sonra göğüs kafesi hızlı bir şekilde açılarak kalp alınmıştır. Kalp daha sonra langerdorff sistemine bağlanarak retrograd şekilde perfüze edilmiştir. Enzimatik uygulama (kollajenaz ve proteaz) sonrası kollajenik doku ve yapılar parçalanarak kardiyomiyositler elde edilmiştir.

Daha önce başka araştırmacıların kullandıkları enzimatik yöntem takip edilerek asılı kalpler önce içeriği (mM): 137 NaCl; 5,4 KCl; 1,2 MgSO₄; 1,2 KH₂PO₄; 5,8 HEPES; 20 glukoz olan ve pH 7.2 dengesinin sağlanması için % 100 O₂ ile gazlanan, kalsiyumsuz perfüzyon solüsyonu ile 5 dakika yıkanmıştır. Arkasından, kalbin üzerinden 20-25 dakika süresince aynı solüsyon içinde hazırlanmış kollajenaz (Roche, Collagenase A type) (0,7 mg/ml) ve proteaz (0.06 mg/ml) karışımı enzim geçirilip uygun kıvama ulaşıldığında, kalp küçük bir kabin içine alındıktan sonra makasla ince bir şekilde dilimlenmiştir.

3.3. L-tipi Ca²⁺ Akımlarının Kaydedilmesi

Bu çalışmada farklı deney koşulları için I_{CaL} ölçülmüştür. Bu akımların kayıtları tüm hücre voltaj kenetleme konfigürasyonunda 1.5-2.0 M Ω 'luk elektrotlar kullanılarak yapılmıştır. Ölçümler için kullanılan pipet solüsyonu (mM): 110 Cs-aspartat; 120 CsCl; 5 MgATP; 120 L-aspartat; 10 NaCl; 10 HEPES; 0.4 GTP (pH= 7,2). Kayıt için, -70 mV düzeyinde kenetlenmiş hücrelere -45 mV'luk ön-puls uygulanarak bu seviyede bir süre tutulmuş ve sodyum (Na⁺) akımları inaktif duruma getirilmiştir. Sonra -50 mV'tan 10 mV'luk artışlarla +60 mV'a 300 ms'lik depolarize edici pulslar uygulanarak 14 farklı voltaj seviyesinde kayıtlar alınmıştır. Her potansiyel için elde edilen akım değereri ölçüm yapılan hücrenin sığasına bölünerek değerlendirildikten sonra, tüm akım değerleri akım yoğunluğunun voltaja göre değişimi olarak verilmiştir.

Kanalların inaktivasyon durumunu gözlemek için -70 mV ile +70 mV arasında 10 mV adımlarla 200 ms süreli prepuls uyguladıktan sonra 3 ms'lik bir süre için tekrar -70 mV seviyesine dönölüp, arkasından zar her defasında yine 200 ms süreyle 0 mV'a kenetlenmiştir. Elde edilen veriler daha sonra Boltzman denkleminde uydurulmuştur. V_{1/2} yarı aktivasyon potansiyelinin değereri, V_m zar potansiyeli ve *k* sigmoidal eğrinin eğim parametresi olmak üzere denklem aşağıdaki gibi yazılabilir.

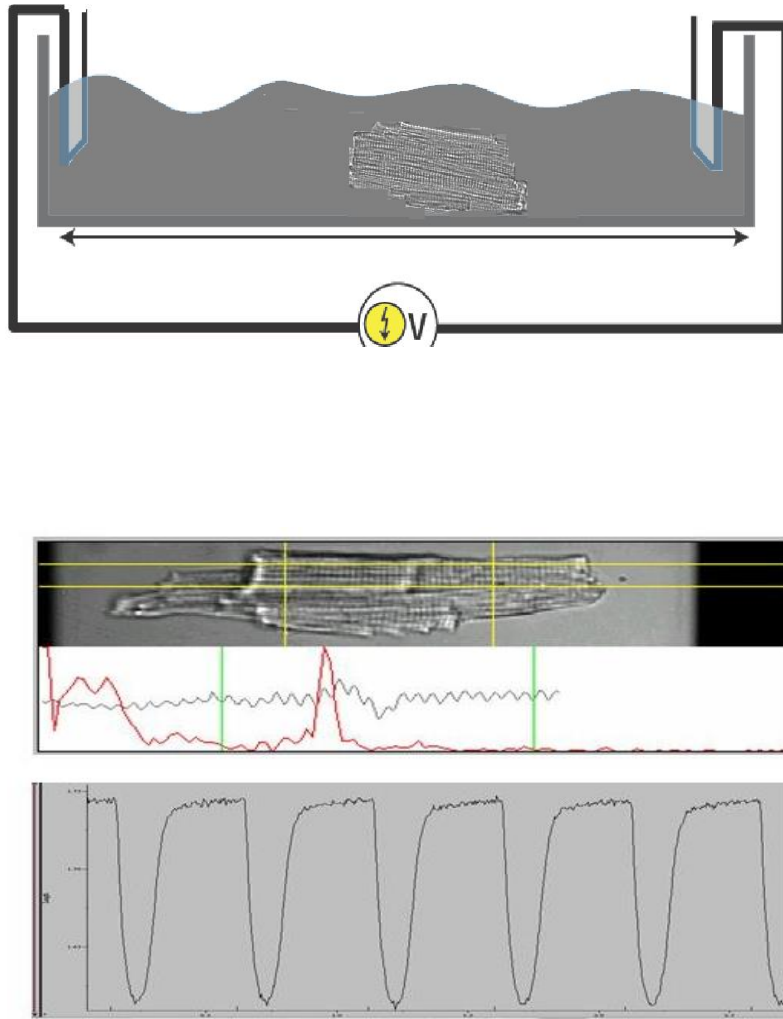
$$(I/I_{max} = [1 + \exp(V_{1/2} - V_m)/k]^{-1}).$$

Reaktivasyon ise; -70 mV'taki zar potansiyeli 200 ms süreyle 0 mV'a kenetlendikten sonra, başlangıçtaki duruma dönölerek 10 ms beklendikten sonra aynı puls tekrar edilerek kaydedilmiştir. Pulslar arasındaki süre olan $\Delta t = 10$ ms olmak üzere aynı protokol 250 ms'ye kadar uygulanmıştır. Her adımda ölçülen akımın tepe değereri maksimum akım değerine oranlanıp 100 rakamı ile çarpıldıktan sonra zamana göre % reaktivasyon hesaplanmış ve bir üssel fonksiyona uydurulmuştur. Reaktivasyon için kullanılan eksponansiyel denklem ise aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$(I/I_{max} = [1 - \exp(-t/\tau)])$$

3.4. Kontraktıl parametreler

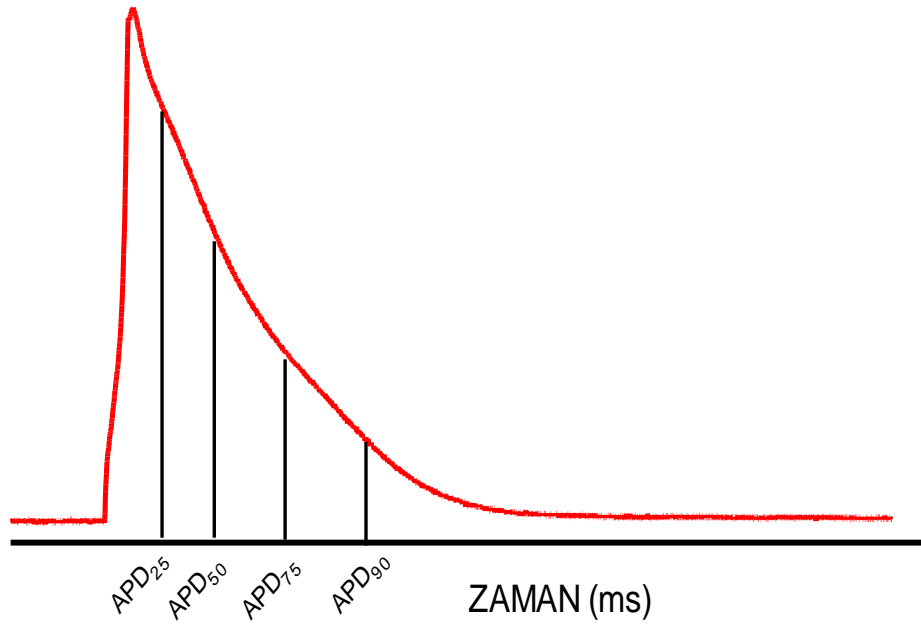
İzole edilen hücreler içinden tyrode solüsyonu (mmol/L olarak; 137 NaCl; 5.4 KCl; 11.6 HEPES; 0.5 MgCl₂; 1.5 CaCl₂, pH: 7.35) geçen ve iki ucunda elektrot yerleştirilmiş poli-lisin kaplı küvet içine alınmıştır. Bu elektrotlarla uyarılan hücrelerden (20-30 V, 1Hz.) kasılma miktarı ve kasılma gevşeme sürelerinin değişimi değerlendirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Elektrik alan altında kasılma parametrelerinin alınması. Üstte, stimulator kullanılarak istenilen genlikte ve frekansta uyarı oluşturabilen elektrotlar varlığında uyarılacak kardiyomiyosit görülmektedir. Ortada, uyarı verildikten sonra hücrenin kasılıp gevşeme işlemi ve sarkomer boyu video tabanlı kameralar yardımıyla eş zamanlı takip edilmekte ve bilgisayar ortamına (altta) aktarılmaktadır.

3.5. Aksiyon Potansiyeli Kayıtları

Çalışmamızda AP kayıtları da alınmıştır. Tüm kayıtlar direnci 2-2.5 M Ω 'luk elektrotlar yardımıyla 1 Hz'lik frekansta yapılmıştır. Pipet içi solusyon (mM): 120 KCl; 6.8 MgCl₂; 5 Na₂ATP; 5; 0.4 Na₂GTP; 10 EGTA; 4.7 CaCl₂; 20 HEPES (pH=7,4). Kayıt için akım kenetleme konfigürasyonunda; hücre içine küçük depolarize edici pulslar enjekte edilerek hücrenin uyarılması sağlanarak membran potansiyel değişimleri gözlemlenmiştir. Elde edilen aksiyon potansiyelinin repolarizasyon fazlarının % 25, 50, 75, 90 (APD₂₅, 50, 75, 90) süreleri değerlendirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Sol ventrikül hücrelerden kaydedilen bir aksiyon potansiyeli eğrisi üzerinde ölçülen parametreler. Şekilde aksiyon potansiyeli repolarizasyonunun (tepe değerinden itibaren) %25, 50, 75 ve 90'ına düşmesi için geçen süreler gösterilmektedir.

3.6. Kullanılan kimyasallar

Ellagik asit, CaCl₂, Glukoz, SQ 22636, KH₂PO₄, HEPES, MgATP, NaGTP, L-NAME, ODQ, Verapamil, Bay K8644 ve Probucol Sigma (SİGMA-ALDRICH chemie GmbH Taufkirchen, Germany)'dan satın alınmıştır. Kollajenaz A ROCHE firmasından alınmıştır.

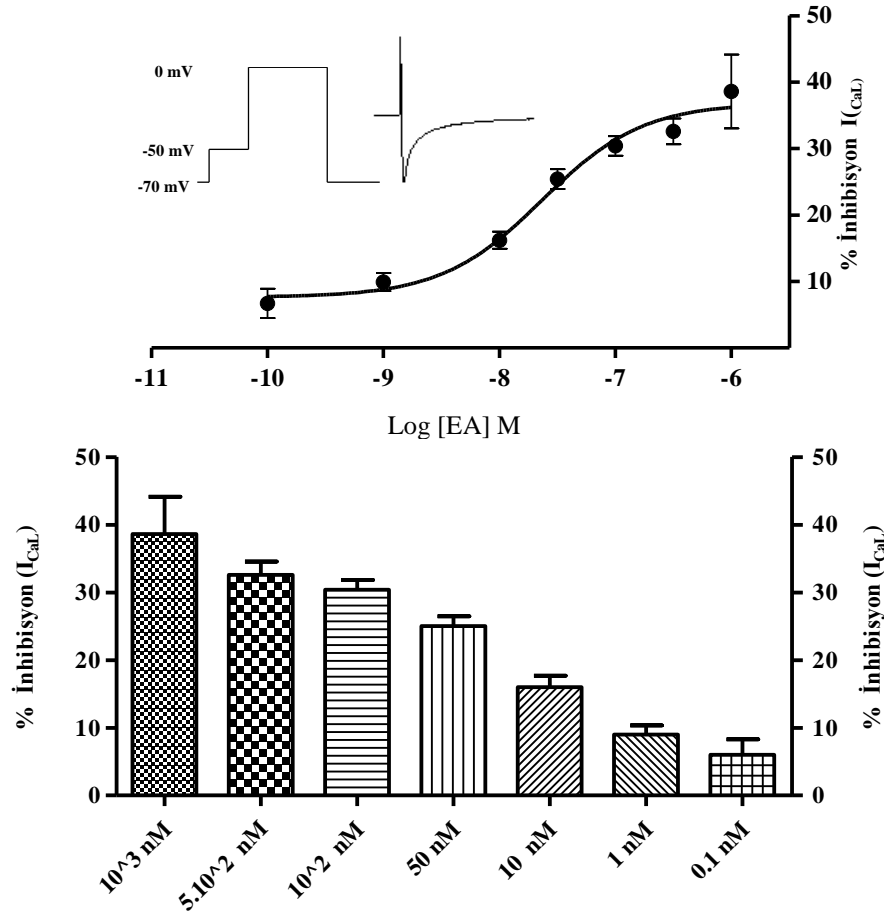
3.7. İstatistiksel Analizler

Deney sonuçları için Paired t-testi kullanılmıştır. Değerler ortalama± SEM olarak verilmiş ve anlamlı fark $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

4.1. Doz yanıt eğrisinin oluşturulması

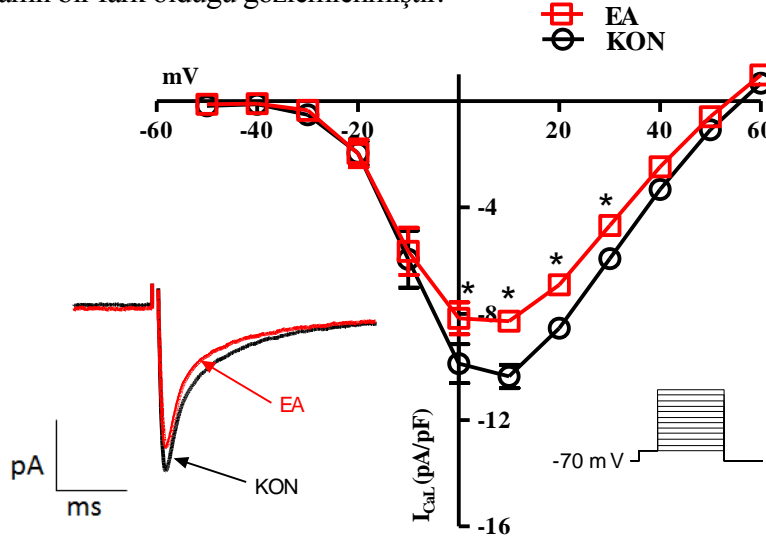
Doz yanıt eğrisi ya da doz etki eğrisi terimsel olarak; maruz kalınan doz ile oluşan etki arasındaki ilişkiyi açıklamaktadır. Ellagik asidin Ca^{2+} akımlarıyla olan konsantrasyon-etki ilişkisini açıklığa kavuşturmak için farklı konsantrasyonlarda EA kullanılarak 0 mV'taki Ca^{2+} akımları kaydedilmiş ve doza bağlı olarak akımlardaki azalma miktarı ölçülerek yüzde inhibisyon olarak ifade edilmiştir. Şekil 4.1'de EA konsantrasyonu ile Ca^{2+} akımları arasındaki ilişkiyi açıklayan doz-yanıt eğrisi gösterilmiştir. Hill denklemleri yardımıyla maksimal etkinin görüldüğü dozun yarısı (EC_{50} , half maximal effective concentration) belirlenmiş ve çalışmamızda bu değer $EA_{EC_{50}}; 10^{-7.63}M$ (23 nM) olarak hesaplanmıştır. Bundan sonraki deneylerimizde de $EA_{EC_{50}}$ değeri kullanılmıştır.



Şekil 4.1 Farklı dozlardaki ellagik asidin I_{CaL} akımlarına etkisi. Farklı konsantrasyonlarda EA kullanılarak elde edilen ortalama I_{CaL} akım inhibisyonu gösterilmektedir. EA kullanılarak elde edilen bulgular Hill denklemleri ($f=1/[1+(EC_{50}/D)]^{n_H}$) göre uydurulmuştur. n_H ; Hill katsayısı, D; kullanılan maddenin konsantrasyonu, EC_{50} ; maksimal etkinin görüldüğü dozun yarısı olarak tanımlanmıştır.

4.2. Ellagik asidin I_{CaL} 'a etkisi

L-tipi Ca^{2+} kanalları AP'nin şeklini etkilemenin yanında SR membranında bulunan RyR reseptörlerinden sitozole Ca^{2+} salınımını tetikleyerek uyarılma-kasılma çiftlenimini düzenleyen temel mekanizmaların başında yer almaktadır. Bu nedenle EA (EC_{50} : 23 nM) varlığında ventrikül miyositlerinden Ca^{2+} akımları kaydedilmiştir. Bu akımların değerlendirilmesiyle elde edilen ortalama akım yoğunluğunun zar potansiyeline göre değişim eğrileri ve örnek akım kayıtları Şekil 4.2'de görülmektedir. Sonuçlara bakıldığında EA'nın ve KON gruplarının akım yoğunlukları (tepe değeri olarak; KON: -10.36 ± 0.43 pA/pF; EA: -8.27 pA/pF; $p < 0.05$) arasında yaklaşık olarak % 20 inhibisyon oranında anlamlı bir fark olduğu gözlemlenmiştir.



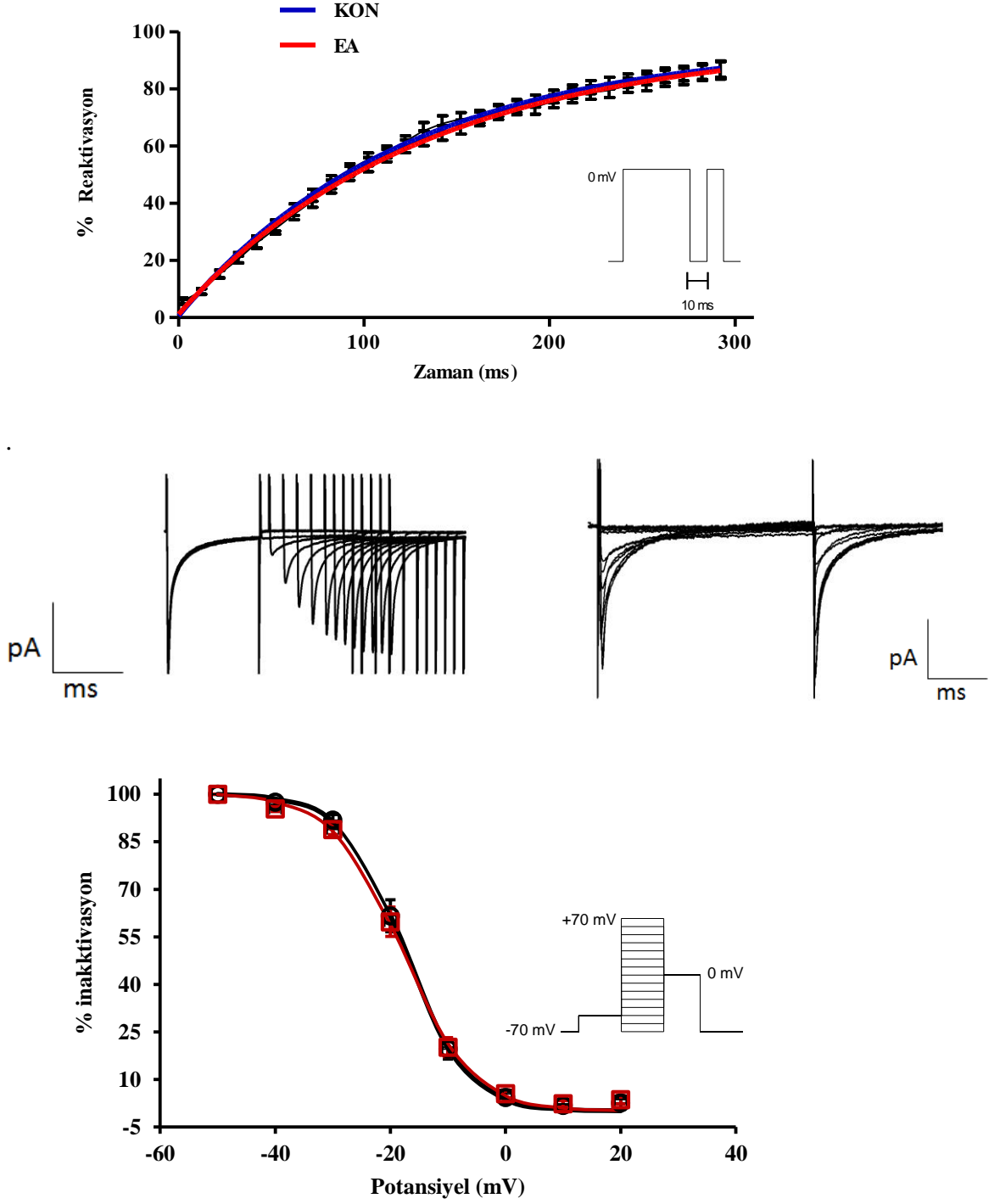
Şekil 4.2. Ventrikül hücrelerinden EA varlığında kaydedilen ortalama I_{CaL} akım yoğunluklarının değişimi ve örnek akım kayıtları. Akımlar -50 mV ile $+60$ mV arasında 10 mV'luk adımlar şeklinde artan 300 ms süreli test pulsarı uygulanarak elde edilmiştir. * $p < 0.05$ vs. KON grubu ($n=13$).

Öte yandan Ca^{2+} akım kinetiklerine bakıldığında EA'nın akımların reaktivasyon ve inaktivasyon parametrelerini değiştirmedığı görülmüştür. Bu sonuç EA'nın Ca^{2+} akımlarını doğrudan dihidropiridin reseptörü aracılığıyla azaltmadığını göstermektedir. Şekil 4.3'de L-tipi Ca^{2+} kanal kinetikleri ve örnek akım kayıtları verilmiş Tablo 3'te ise Boltzman denklemi yardımıyla hesaplanan kinetiklere ait parametreler gösterilmiştir.

Tablo.3. Ellagik asidin varlığında kaydedilen Ca^{2+} akımlarının yoğunluğu ve kinetik parametrelerinin değerleri.

	Ca^{2+} akım yoğunluğu ve kinetik parametreleri			
	Maks. Akım pA/pF	$V_{1/2}$ inakt (mV)	k (inakt)	Tau (ms)
KON	-10.36 ± 0.43 ($n=13$)	-17.42 ± 0.34 ($n=11$)	-5.33 ± 0.47 ($n=11$)	122.2 ± 16.5 ($n=10$)
EA	$-8.27^* \pm 0.3$ ($n=13$)	-17.66 ± 0.14 ($n=11$)	-5.84 ± 0.25 ($n=11$)	131.6 ± 15.5 ($n=10$)

Değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir. * $p < 0.05$ vs KON grubu.

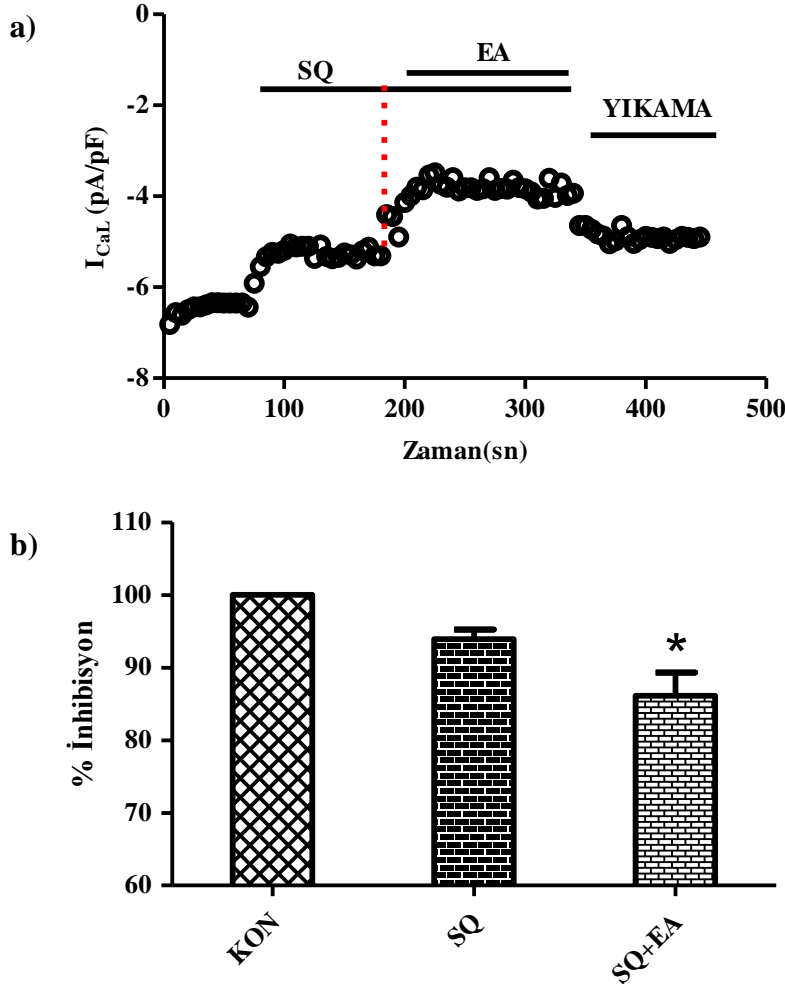


Şekil 4.3. Ellagik asidin I_{CaL} yoğunluğu ve kinetik parametrelerine etkisi. *Üstte*; Reaktivasyon grafiği, *altta*; inaktivasyon grafiği ve örnek kayıtlar gösterilmiştir. EA varlığında kaydedilen ortalama akım yoğunlukları, deneysel verilere Boltzman denklemlerinin uygulanması ile çizdirilmiş inaktivasyon ($I/I_{max} = [1 + \exp(V_m - V_{1/2})/k]^{-1}$) eğrileri. $V_{1/2}$; inaktivasyon'un %50 değerine ulaştığı potansiyel ve k eğim parametresidir. Reaktivasyon değerlerine ise, $I/I_{max} = [1 - \exp(-t/\tau)]$ üssel fonksiyon denklemi uydurulmuştur. Değerler ortalama \pm SEM olarak verilmiştir.

4.3. Ellagik asidin etki mekanizması

4.3.1. β -adrenerjik sistem inhibisyonu

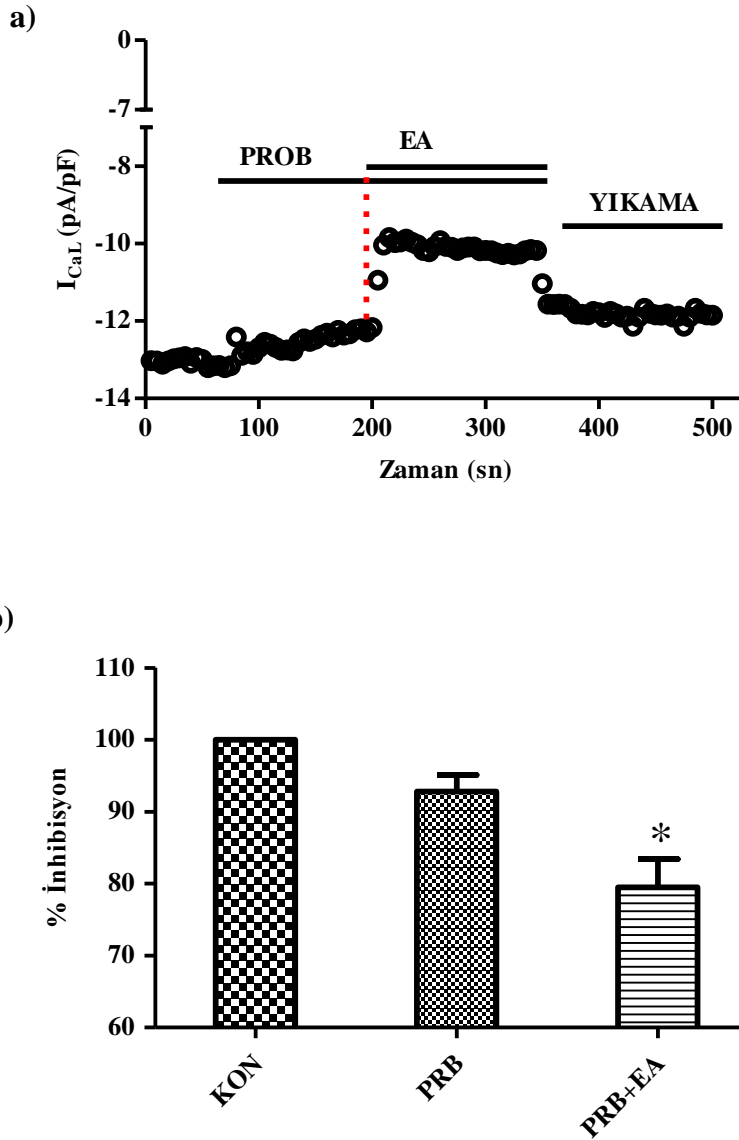
β -adrenerjik sistem stres veya egzersiz durumunda kardiyak debiyi arttıran en temel mekanizmadır. Bu nedenle EA'nın Ca^{2+} akımlarına olan etkisinin β -adrenerjik sistemle ilişkisini belirlemek için AS inhibitörü olan SQ 22536 (10 μ M) kullanılmıştır. Adenilil siklaz ATP'den cAMP reaksiyonu katalizleyen bir enzim olup SQ 22536 uygulamasının cAMP oluşumunu engellediği bilinmektedir. Çalışmamızda SQ 22536 verilen hücrelerde Ca^{2+} akımlarının %6.08 (n=7) azaldığı görülmüştür. Ancak SQ 22536 ile birlikte EA verildiğinde (EC_{50}) Ca^{2+} akımlarında %13.94'lik anlamlı bir azalmanın olduğu belirlenmiştir (n=7). Bu bulgular EA'nın etki yolağının β adrenerjik sistem üzerinden gerçekleşmediğini göstermektedir. Şekil 4.4'te SQ 22536 ve EA varlığında 0 mV'taki Ca^{2+} akımı ve yüzde inhibisyon miktarları verilmiştir.



Şekil 4.4. SQ 22536 (AS inhibitörü) varlığında EA'nın I_{CaL} akımlarına etkileri. SQ22536 ve EA'nın; a)'da 0 mV'ta I_{CaL} akımlarına etkileri, b)'de ortalama % inhibisyon miktarı gösterilmiştir. * $p < 0.05$ vs SQ (n=7).

4.3.2. Antioksidan Sistem Aktivasyonu

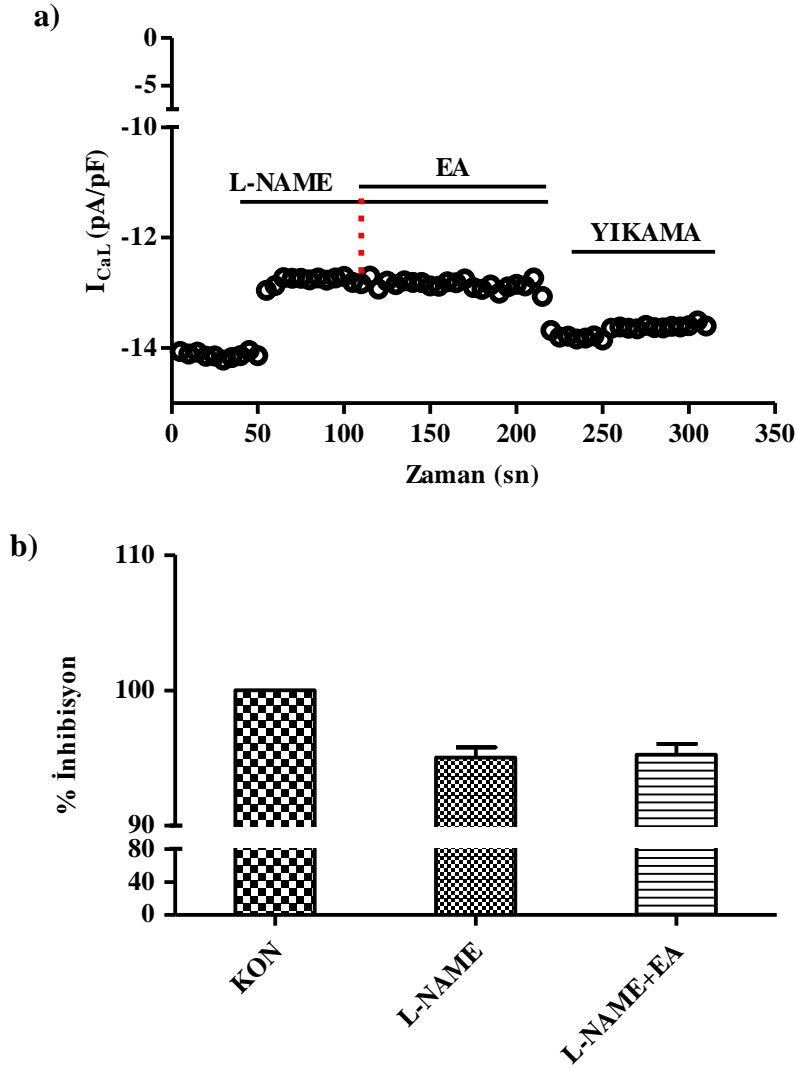
Reaktif oksijen türevleri kardiyovasküler hastalıkların oluşumunda kilit rol oynamaktadır. Günümüzde EA gibi pekçok antioksidan yapı redoks tepkimeleriyle kanalları oksidasyona uğratarak işlevlerini etkiledikleri bilinmektedir. Bu nedenle EA'nın antioksidan sistem üzerinden I_{CaL} üzerine etki edip etmediğini anlamak için bir antioksidan olduğu iddia edilen probucol kullanılmıştır. Şekil 4.5'de probucol ve EA varlığında 0 mV'taki Ca^{2+} akımı ve % inhibisyon miktarları verilmektedir. Probucol ($5\mu M$) tek başına Ca^{2+} akımlarını %8.22 ($n=8$) azaltmıştır. Probucol varlığında EA verildiğinde (EC_{50}) ise yüzde 20.50'lik ($n=8$) anlamlı ekstra bir azalmanın olduğu görülmüştür. Bu veriler EA'nın etki mekanizmasının antioksidan sistem üzerinden olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.5. Probucol (antioksidan) varlığında EA'nın I_{CaL} 'ya etkisi. Probucol ve EA'nın a)'da 0 mV'ta I_{CaL} akımlarına etkileri, b) Ortalama inhibisyon değerleri gösterilmiştir. * $p<0.001$ vs. PRB, ($n=9$)

4.3.3. NOS-GS-cGMP yolağının rolü

Ellagik asidin Ca^{2+} akımlarına olan etkisinin NO yolağı üzerinden olup olmadığını anlamak için spesifik olmayan NOS inhibitörü olan L-NAME (500 μ M) kullanılmıştır. Şekil 4.6'da L-NAME ve EA varlığında 0 mV'taki Ca^{2+} akımı ve % inhibisyon miktarları verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında L-NAME'in Ca^{2+} akımlarını %4.97 azalttığı görülmüştür. Ancak ilginç bir şekilde L-NAME ile beraber EA verildiğinde (EC₅₀) ise herhangi bir azalmanın olmadığı görülmüştür. Başka bir deyişle NO inhibisyonu EA'nın etkisini ortadan kaldırmaktadır. Bu sonuç EA'nın bu yolak üzerinden Ca^{2+} akımlarına etki ettiğine işaret etmektedir.

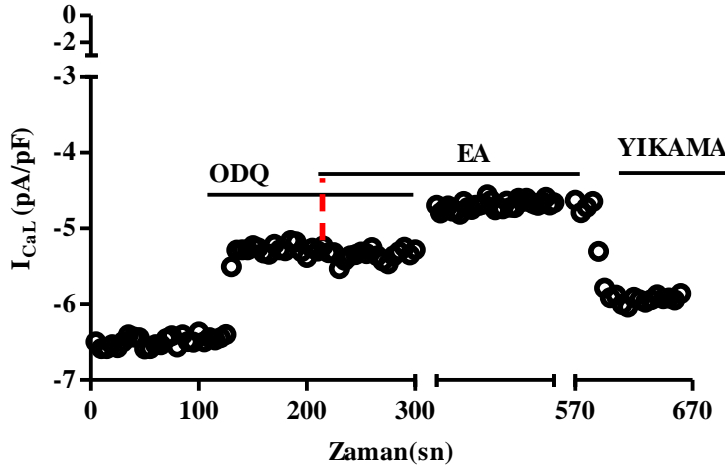


Şekil 4.6. L-NAME (NOS inhibitörü) varlığında EA'nın I_{CaL} akımlarına etkileri. L-NAME ve EA'nın; a) 0 mV'ta I_{CaL} akımlarına etkileri, b) % inhibisyon miktarlarının ortalama değerleri gösterilmektedir. $p > 0.05$ vs. L-NAME (n=14).

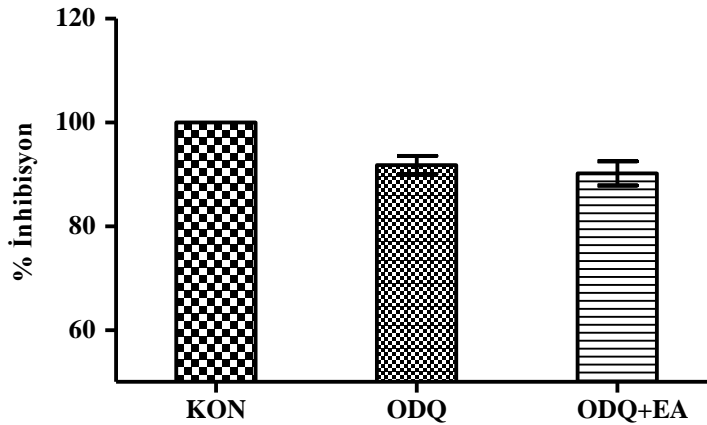
Bu etkinin NO ilişkisini teyit etmek ve hangi sinyal yolaqlarını kullandığını aydınlatmak için, bir sonraki aşamada GS-cGMP yolağının inhibisyonu varlığında EA'nın etkisine bakılmıştır. Çünkü cGMP kaskadı kalbin fizyolojik aktivitelerinin

düzenlenmesinde önemli olduğu gibi, bu yolağın aktive edilmesi bazı kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan temel stratejilerden birisidir. Çalışmamızda L-NAME verilerinden elde ettiğimiz bilgilerin doğrultusunda GS inhibitörü olan ODQ (1 μ M) kullanılmıştır. Şekil 4.7’de ODQ ve EA varlığında I_{CaL} değerleri ve % inhibisyon miktarları verilmiştir. Bir süre akım alınıp kararlı duruma ulaşıldıktan sonra, hücrelere tek başına ODQ verildiğinde Ca^{2+} akımlarının % 8.2 azaldığı gözlenmiştir. ODQ ile beraber EA verildiğinde (EC_{50}) ise herhangi bir azalmanın olmadığı gözlenmiştir. Bu bulguları NOS inhibisyonundan elde edilen verileri desteklediğinden EA’nın Ca^{2+} akımlarına olan etkisinin NO-GS-cGMP yolağı üzerinden olduğu kanaatine varılmıştır.

a)



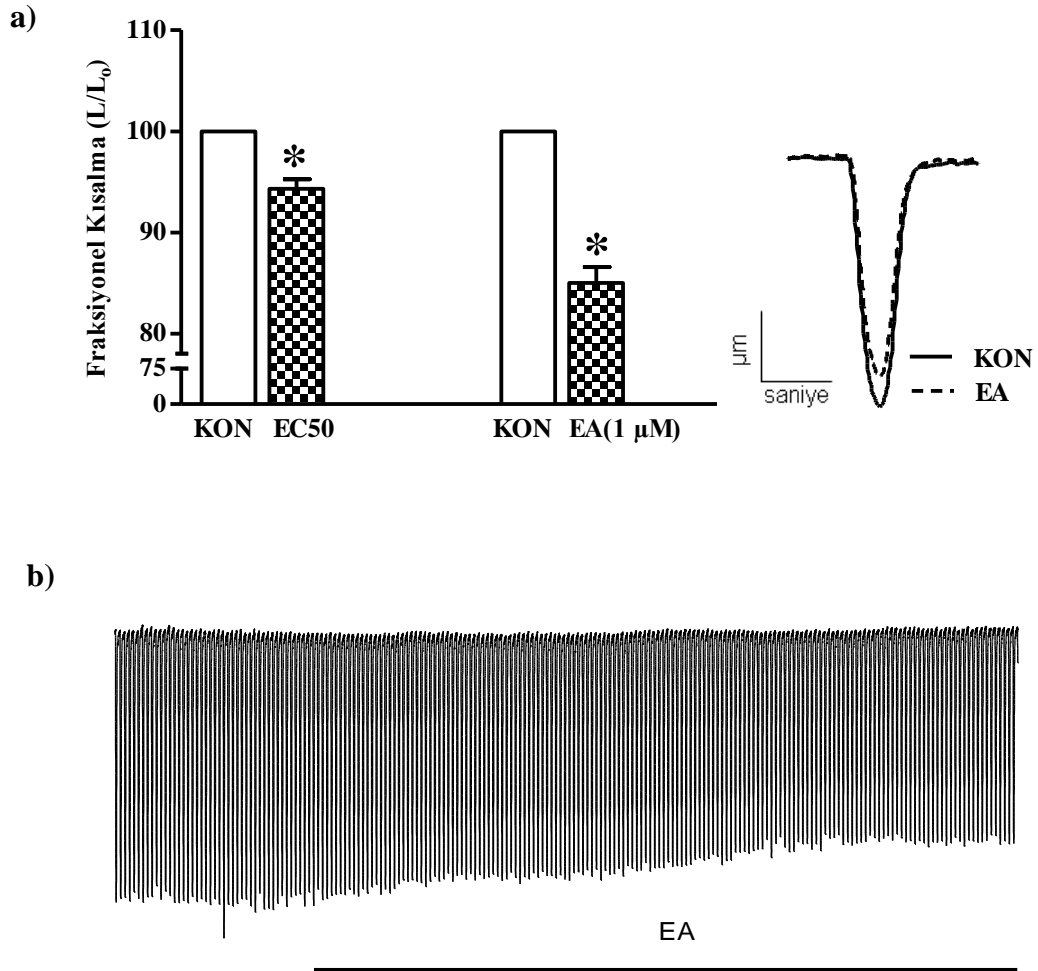
b)



Şekil 4.7. ODQ(GS inhibitörü) varlığında EA'nın I_{CaL} 'ya etkisi. ODQ ve EA'nın; a) 0 mV'ta ODQ uygulaması devam ederken EA verildiğinde akımda değişiklik olmadığı, fakat hemen arkasından EA tek başına verildiğinde I_{CaL} üzerindeki baskılayıcı etkisinin ortaya çıktığı görülmektedir. b) Ortalama % inhibisyon miktarları gösterilmiştir. $p > 0.05$ vs ODQ (n=9).

4.4. Ellagik asidin kasılma parametrelerine etkisi

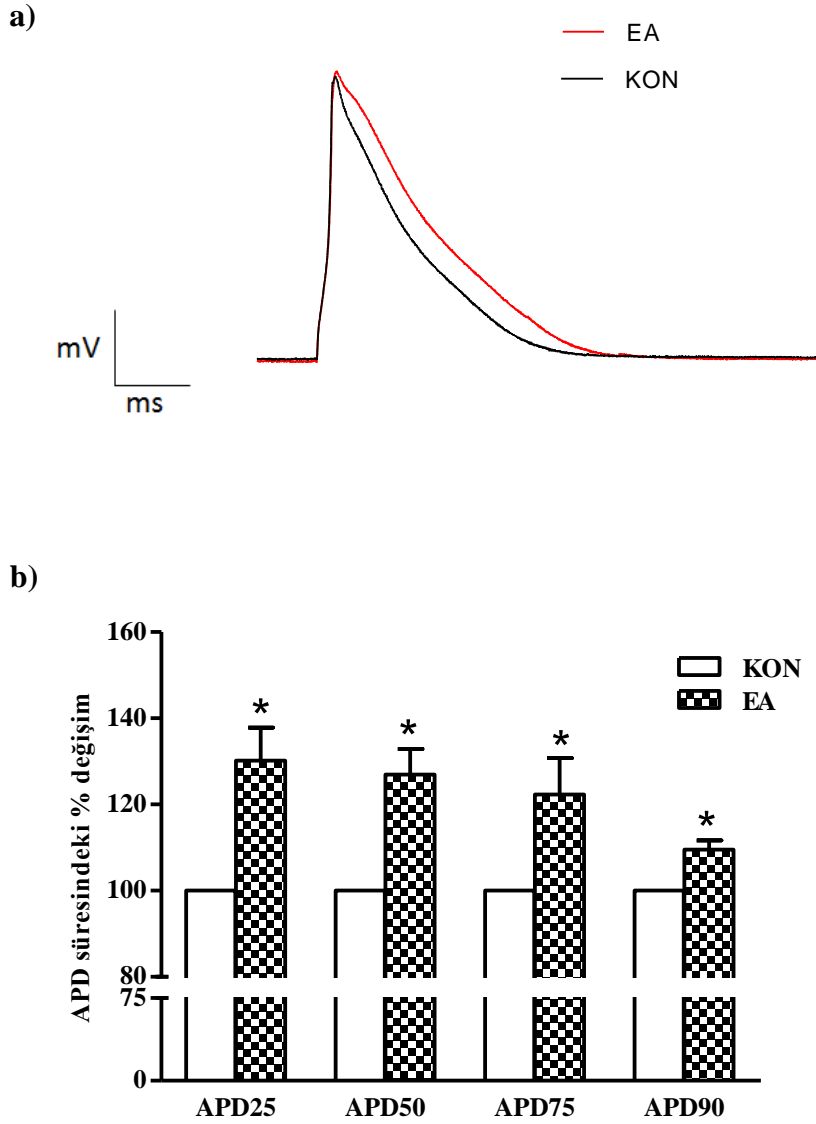
Ellagik asidin Ca^{2+} akımları üzerindeki baskılayıcı etkinin fonksiyonel parametrelerle ilişkisini belirlemek için ventrikül miyositlerinde kasılma cevaplarına bakılmıştır. Bunun için elektrik alan uyarısı altında hücre boyutundaki kışalmanın başlangıç uzunluğuna oranı (fraksiyonel kışalma) ölçülmüştür. Şekil 4.8’de EA’nın fraksiyonel kışalmaya etkisi ve örnek kasılma kaydı şekli verilmiştir. Kalbin mekanik aktivitesine bakıldığında EC_{50} konsantrasyonu olan 23 nM’da EA’nın fraksiyonel kışalmayı %5.7 oranında anlamlı olarak azalttığı görülmüştür. Maksimum dozda (1 μ M) bu azalmanın %15.01 ile daha da arttığı görülmüştür. Bu bulgular EA’nın negatif inotropik etkisinin olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.8. Ellagik asidin EC_{50} ve maksimum dozlarının 1 Hz frekanslı alan uyarısı altında hücrenin fraksiyonel kışalma değerlerine etkisi. a) Hücre boyutundaki kışalmanın başlangıç uzunluğuna oranı olan fraksiyonel kışalma oranı gösterilmektedir (L/L_0). b) Elektrik alan uyarısı altında ve EA varlığında kasılmadaki değişimin örnek kaydı görülmektedir. $p < 0.001$ vs. KON ($n=15$).

4.5. Ellagik Asidin aksiyon potansiyeline olan etkisi

Ellagik asidin sol ventrikül hücrelerindeki APD parametreleri incelenmiştir. Bu parametreler repolarizasyonun dört evresine ulaşma süreleridir. Bu süreler AP'nin tepe değerinden repolarizasyon fazının %25, 50, 75 ve 90'ına ulaşma zamanı olarak seçilmiş ve APD₂₅, APD₅₀, APD₇₅ ve APD₉₀ olarak temsil edilmişlerdir. Kayıtların analizinden EA'nın kontrol değerlerine göre APD değerlerini (%30.2 ±7.61, %26.98 ±5.95, %22.34 ±8.43, 9.54 ±2.16) anlamlı derecede uzattığı görülmüştür (Şekil 4.9). İçeri doğru bir akım olan I_{CaL}'in azalması APD süresinin kısalmasına işaret etmesine rağmen bu bulgular EA'nın potasyum akımlarına da etki ettiğine düşündürmektedir.



Şekil 4.9. Ellagik asidin (1µM) miyosit aksiyon potansiyeline etkisi. a) Normal solüsyonda ve EA uygulamasından sonra kaydedilen AP traseleri, b) Ellagik asidin APD değerlerine olan etkisinin % değişimini göstermektedir. *p<0.01 vs. KON (n=12).

TARTIŞMA

Fenoller, flavonlar ve flavonoid gibi yapıların insan sağlığına olan etkileri gün geçtikçe artmakta ve bu olumlu etkiler deneysel bulgularla da desteklenmektedir. Bugüne kadar yapılan bu yapıların antikarsinojen, antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel ve antiaterosklerotik gibi birçok etkilerinin olduğunu göstermektedir [2, 5-8]. Ellagik asit gibi güçlü bir antioksidan özelliğe sahip fenolik bileşikler başta nar olmak üzere, tüm üzümü meyvelerde yüksek oranda bulunmakta ve sahip olduğu terapötik etki potansiyeli nedeniyle önemli fitonutrient olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan çalışmalar EA'nın kardiyoprotektif etkisinin olabileceğini de göstermektedir. Bu bilgilerin ışığı altında çalışmamızda EA'nın sıçan kardiyomiyositlerinde Ca^{2+} akımlarına ve kardiyak kontraktileteye etkisi kapsamlı bir şekilde ilk kez ortaya konmuştur. Taze izole edilmiş kardiyomiyositlerden EA'nın farklı dozları uygulanarak 0 mV'ta kalsiyum akımları kaydedilmiş ve doz yanıt ilişkisi ortaya konmuştur. Buradan hareketle EA'nın Ca^{2+} akımlarına etki eden maksimal ve minimal dozları belirlenmiş ve sonra da Hill denklemi yardımıyla EC_{50} belirlenmiştir. Bulgularımızdan elde ettiğimiz EA'nın EC_{50} konsantrasyonunun (23 nM) literatürdeki verapamil EC_{50} dozundan (243 nM) farmakolojik açıdan daha etkin olduğu görülmektedir [108]. Çalışmamızda daha sonra EA'nın bu etkisini hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştirebileceğini aydınlatan kapsamlı deney süreçleri gerçekleştirilmiştir. İlk olarak etki mekanizmasının β -adrenerjik sistem aracılı olup olmadığını anlamak için AS inhibitörü kullanılmış, böylece cAMP oluşumu engellenerek EA'nın β -adrenerjik sistemle ilişkisi belirlenmiştir. Bir sonraki adımda EA'nın etki mekanizmasının antioksidan sistem üzerinden olup olmadığı belirlemek için başka bir antioksidan kullanılmıştır. Böylece EA'nın etki yolağının antioksidan sistemle olan ilişkisi aydınlatılmıştır. Mekanizmanın belirlenmesinde bir sonraki aşamada ise spesifik olmayan NOS inhibitörü ve GS inhibitörü kullanılarak etkinin NOS-GS-cGMP aracılı olup olmadığı açıklığa kavuşturulmuştur. Çalışmamızın sonraki aşamasında ise EC_{50} dozu kullanılarak L-tipi Ca^{2+} akımlarının, potansiyele bağlı değişimine etkisi ve kanalın inaktivasyon-reaktivasyon gibi kinetik davranışlarındaki muhtemel değişiklikler incelenmiştir. Ellagik asidin AP'ye olan etkisi de çalışmamız kapsamında belirlenmiştir. Öte yandan EA'nın kalbin mekanik aktivitesine etkisini belirlemek için EC_{50} ve maksimal dozlarda kardiyomiyositlerde kasılma yanıtı incelenmiştir. Tüm bu sonuçlar ele alındığında EA'nın kardiyomiyositlere olan etkisinin iyonik ve mekanik özelliklere nasıl ve hangi yollar aracılığıyla etki ettiğini açıklığa kavuşturması yönünden çalışmamız literatüre büyük katkılar sağlayacaktır.

β -adrenoreseptör stimülasyonu kardiyak debisini ve kontraktilesini arttıran en önemli mekanizmalardan biridir [109]. β adrenerjik stimülasyon, G proteinlerinin aktivasyonu ile başlar. Reseptöre liganda bağlandıktan sonra GTP bağlayıcı proteinden alfa alt biriminden ayrılmasını sağlayarak AS'yi aktive eder. Aktive olan

AS PKA'yı tetikleyen cAMP'nin sentezini arttırır. PKA aktifleştikten sonra LTCC, RyR PLB ve troponini fosforilleyerek hücre içi Ca^{2+} regülasyonuna etki eder [85]. Bu nedenle çalışmamızda AS inhibitörü (SQ 22536) uygulaması ile β -adrenerjik yolağın aktivasyonu engellenmiş ve Ca^{2+} akımlarına bakılmıştır. AS inhibitörünün tek başına verildiğinde I_{CaL} 'i bir miktar azalttığı, ancak SQ varlığında hücreye EA verildiğinde azalmanın daha da büyük olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar EA'nın I_{CaL} üzerine olan etkisinin β -adrenerjik sistemden bağımsız olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmamız çerçevesinde EA'nın I_{CaL} üzerine olan etkisinin antioksidan sistemle ilişkisi olup olmadığı da irdelenmiştir. Çünkü serbest radikallerin protein yapısında olan kanalları etkileyebileceği birçok çalışmada gösterilmiştir [110-112]. Bu nedenle EA'nın Ca^{2+} akımlarına olan etkisinin kanalların oksidasyonu ile ilişkisi olup olmadığını anlamak için bir antioksidan olan probucol ile Ca^{2+} akımlarına bakılmıştır. Probucol'un Ca^{2+} akımlarını azalttığı görülmüş ancak EA'nın probucolle birlikte bu etkiyi daha da arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç bir antioksidan olduğu iddia edilen EA'nın Ca^{2+} akımlarına olan etkisinin "oksidan-antioksidan" sistem üzerinden gerçekleşmediğini ortaya koymaktadır.

Uyarılma kasılma çiftlenimde, depolarizasyonla birlikte LTCC aracılığıyla hücre içine Ca^{2+} girişi olmakta ve RyR'nin tetiklenmesiyle SR'dan yüksek miktarda Ca^{2+} salınımı gerçekleşmektedir [85]. Bu nedenle uyarılma-kasılma çiftleniminde moleküler arası etkileşimlerin temelinde Ca^{2+} akımları yatmakta ve Ca^{2+} akımlarındaki değişim ciddi fonksiyonel bozukluklara yol açmaktadır. Çalışmamızda EA'nın I_{CaL} 'i anlamlı düzeyde baskıladığı gözlemlenmiştir. Son yıllarda yayınlanan çalışmalarda NOS-GS yolağının kardiyomiyositlerin Ca^{2+} sinyal mekanizmaları üzerine etki ettiği bildirilmiştir [92, 97, 113, 114]. Özellikle eNOS'un caveolar yapılarında LTCC ve β -adrenerjik reseptörler ile birlikte bulunduğu ve aktivasyonu sonucu oluşan NO'nun Ca^{2+} akımlarını azaltabileceği ve β -AR indüklü kardiyak inotropiyi düzenleyebileceği bildirilmiştir [115]. Yapılan bir çalışmada EA benzeri bir fenolik bileşik olan resveratrol'un NOS aktivitesini arttırarak NO oluşumuna neden olduğu ve ventrikül miyositlerinin Ca^{2+} homeostazisini etkilediği gösterilmiştir [116-118]. Benzer şekilde, polydatin olarak bilinen bir fenolik bileşiğin kardiyomiyositlerin Ca^{2+} akımlarını NOS aracılığıyla azalttığı yakın zamanda ortaya konulmuştur [119]. Chang ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda EA'nın eNOS-NO yolağını modüle ederek endotel hücreleri okside-LDL indüklü apoptozdan koruduğunu ileri sürmüşlerdir [83]. Ellagik asidin NO sinyal sistemi ile ilişkisini gösteren bu verilerden yola çıkarak ventrikül miyositlerine L-NAME uygulamak suretiyle EA'nın akımlar üzerindeki etkisinin de bu sinyal molekülü aracılığıyla olup olmadığı test edilmiştir. NOS aktivitesi inhibe edilerek NO oluşumu engellendiğinde EA'nın Ca^{2+} akımlarına olan etkisinin tümüyle ortadan kalktığı görülmüştür. Buna paralel olarak GS inhibitörü olan ODQ verildiğinde de EA'nın I_{CaL} 'i baskılayamadığı tespit edilmiştir. Tüm bu bulgular birlikte ele alındığında EA'nın NOS-GS-cGMP aracılığıyla LTCC'lere etki ederek Ca^{2+} akımlarını azalttığını açıklıkla göstermektedir.

Yakın dönemde yapılan birçok çalışma NOS-GS-cGMP-PKG sinyal yolağının β -adrenerjik aktivasyonunu inhibe ettiğini bildirmektedir [113, 114, 120, 121]. Ziolo ve arkadaşları PDE5 inhibitörü olan zaprinast'ın isoproterenol indüklü I_{CaL} artışını baskıladığını göstermişlerdir [95]. Takimoto ve arkadaşları ise bu anti-

adrenerjik etkinin altında yatan mekanizmanın PKG'nin LTCC'yi fosforilasyona uğratarak inhibe etmesi olduğunu ileri sürmüşlerdir [113]. Bu etki insan çalışmalarından elde edilen bulgularla [122] da uyumlu olduğundan gelecekte EA'nın anti-adrenerjik etkisine bakılarak potansiyel bir PDE5 inhibitörü olup olmayacağı açıklığa kavuşturulacaktır.

Ellagik asidin Ca^{2+} kanalları üzerine doğrudan etkisinin olup olmadığını belirlemek için zamana bağlı reaktivasyon ve potansiyele bağlı inaktivasyon parametreleri incelenmiştir. Timothy ve arkadaşları voltaj duyarlı Ca^{2+} kanal kinetiklerinin uçucu organik çözücüler tarafından etkilendiğini bildirmişlerdir [123]. Buna benzer şekilde Vaquero ve arkadaşları atorvastatin ve simvastatinin K^+ kanal kinetiklerini değiştirdiğini belirlemişlerdir [124]. Her iki çalışmada da bu yapıların kanal yapısıyla doğrudan etkileşime girerek kanal dinamiğini değiştirdiği öne sürülmektedir. Çalışmamızda EA'nın LTCC inaktivasyon ve reaktivasyon parametrelerine etki etmediği görülmüş ve EA'nın kanal yapısıyla doğrudan ilişkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

Bu çalışma kapsamında EA'nın I_{CaL} üzerindeki baskılayıcı etkisinin kardiyak kontraktiliteye hangi ölçüde yansıdığı da irdelenmiştir. Çünkü bizden önceki çalışmalar cGMP-PKG sisteminin kardiyomiyositlerde kontraktilitiyi negatif yönde modüle ettiğini göstermişlerdir [114, 125]. Layland ve arkadaşları sıçanlarda yaptıkları çalışmalarda NO donorünün negatif inotropik etkilere yol açtığını ve gevşemeyi hızlandırdığını [126], Wegener ve arkadaşları ise farelerde yaptıkları çalışmalarda cGMP analoglarının negatif inotropiyi indüklediğini ancak PKGI knock-out farelerde bu etkinin görülmediğini rapor etmişlerdir [127]. Bu etki muhtemelen PKG'nin bazı proteinleri (LTCC, PLB, titin, troponin) fosforilasyona uğratmasıyla ortaya çıkmaktadır [125, 128]. Yapılan bir çalışmada EA'nın da Troponin fosforilasyonuna neden olduğu bildirilmiştir [13]. Çalışmamızda ise EA'nın EC_{50} konsantrasyonunun fraksiyonel kısalmayı azalttığı maksimum dozun ise bu etkiyi daha da arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu bulgulara göre EA NOS-GS-cGMP yolağını regüle ederek negatif inotropik etkisini göstermektedir.

Ellagik asidin Ca^{2+} akımlarını azaltmasına rağmen ilginç bir şekilde AP'nin repolarizasyon fazını anlamlı derecede uzattığı görülmüştür. AP'deki bu uzamaya neden olan mekanizmalara ilişkin çeşitli varsayımlar bildirilmiştir. Pek çok çalışmada AP'deki uzamanın K^+ akımlarının azalmasından kaynaklandığı bildirilmektedir [129-131]. Öte yandan Vaquero ve arkadaşları AP'yi uzatan ve kalsiyum akımlarını azaltan bir maddenin anti-aritmik olabileceğini iddia etmişlerdir [124]. Bu nedenle çalışmamızdaki bulgulardan, EA'nın potansiyel bir anti-aritmik etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu etkinin daha etraflıca aydınlatılması ilerdeki çalışmalarımızla belirlenecektir.

Ellagik asidin Ca^{2+} akımlarına etkisi ve moleküler mekanizması kardiyak fizyoloji ve patofizyoloji açısından oldukça önem arz etmektedir. Nitekim cGMP'nin endotelial, vasküler düz kas ve kardiyomiyosit fonksiyonları için hayati önem taşıyan ikincil bir haberci olduğu bilinmektedir [128]. GS aracılığıyla oluşturulan cGMP, etkisini cGMP-kapılı katyon kanalları, cGMP bağımlı protein kinazlar ve cGMP ile regüle edilen PDE'ler aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Kardiyovasküler sistemde kanal kondüktansından hücre büyümesine, apoptozisten hücrel kontraktiliteye

kadar pek çok fizyolojik duruma aracılık etmektedir. cGMP kaskadı, vasküler endoteliumda hücre proliferasyonunu uyarır ve permeabiliteyi artırır. Vasküler düz kas hücrelerinde proliferasyonu ve vazorelaksasyonu tetikler. Kardiyak miyokardiyumda ise hipertrofiyi inhibe eder ve kontraktileti düzenler. Sentezinden degradasyonuna kadar cGMP kaskadındaki anormallikler, kardiyovasküler hastalıkların patogeneze önemli derecede etki etmekte ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için potansiyel bir farmakolojik hedef olarak karşımıza çıkmaktadır.

Kardiyak cGMP sistemi; hipertrofi, kalp yetmezliği, iskemik hasar ve kardiyomiyopati gibi patofizyolojik koşullarda kalbi koruyan en temel mekanizmalardan biridir [114, 132]. Nitekim bugüne kadar GS-cGMP yolağının kardiyoprotektif etkilerinin olduğu birçok çalışmada deneysel olarak da gösterilmiştir [95, 115, 128, 133]. Özellikle bu yolağın aktive edilmesi için kullanılan temel stratejilerden birisi PDE5 inhibitörlerinin kullanılmasıdır. PDE5 inhibitörleri (sildenafil, vardenafil, tadalafil) günümüzde hala erektil disfonksiyonların tedavisinde ve pulmoner hipertansiyon tedavisinde sıkça kullanılmaktadır. Guazi ve arkadaşları yaptıkları insan çalışmalarında 1 yıl sildenafil tedavisinin kalp yetmezliğinden muzdarip hastalarda kardiyak fonksiyonları ve egzersiz performansını arttırdığını [134], Gianetta ve arkadaşları diabetik kardiyomiyopati hastalarında 3 aylık sildenafil tedavisinin kardiyak kinetiklerini düzelttiğini bildirmişlerdir [135]. Leptin eksikliği olan farelerde PDE5 inhibisyonunun redoks regülasyonu, sitoskelet reorganizasyonu ve proteomik profili değiştirdiği bildirilmektedir [136]. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda GS-cGMP yolağının kalp yetmezliği ve diyabette tedavi edici bir hedef olabileceğine işaret etmekte ve bulgularımızdan elde ettiğimiz sonuçlardan hareketle ellagik asidin bu yolak üzerinden tedavi edici olabileceği düşünülmektedir. Kardiyak hipertrofi çalışmalarında ise elde edilen bulgular GS-cGMP sinyal yolağının kardiyak hipertrofi sırasında gerçekleşen yeniden modellenmede negatif bir regülatör görevi üstlenerek bu oluşumu engellediğini ortaya koymaktadır [120, 128, 137]. G_q agonisti verilen kültür kardiyomiyosit hücrelerinde hipertrofinin ANP, NO, cGMP, veya PKG aracılığıyla baskılandığı [138] sıçanlarda yapılan çalışmalarda PDE5 inhibitörü olan sildenafilin miyokardiyal PKG'yi aktive ederek kardiyak hipertrofi ve yeniden modellenmeyi baskıladığı bildirilmiştir [133]. Bu veriler GS-cGMP kaskadının anti-hipertrofik etki edebildiğini göstermekte ve hipertrofik patogeneze bu yolağın EA aracılığıyla gerçekleşebilecek olan regülasyonu büyük önem kazanmaktadır. GS-cGMP yolağı ayrıca iskemik hasar ve doxorubicin toksisitesine karşı kardiyoprotektif bir etki göstermektedir. İskemik reoksijenasyona maruz bırakılan kalp hücrelerinde NO, BNP ve cGMP analoglarının hücre ölümlerini azalttığı bildirilmiştir [139]. İskemik reperfüzyondan sonra PKG eksik farelerde infarkt alanının kontrollerden daha büyük olduğu bildirilmiştir [140]. Bunun yanında hem in-vivo, hem de in-vitro çalışmalar NO donörlerinin infarkt alanını azalttığını ve post iskemik sürece katkı sağladığını göstermektedir. İskemi öncesi veya iskemik sonrası NOS inhibe edildiğinde kardiyoprotektif etkilerin azaldığı bildirilmiş ve bunda GS-cGMP'nin dolayısıyla ellagik asidin iskemik öncesi ve iskemik sonrası durumlardaki koruyucu etkisine ilişkin kanaatleri desteklemektedir [141].

Sonuç olarak, çalışmamız bitki orijinli bir polifenol olan ellagik asidin kardiyovasküler sisteme olan iyonik ve mekanik etkisini ortaya koymaktadır. Ellagik asit NOS-GS-cGMP aracılığıyla LTCC kanalları üzerinden $[Ca^{2+}]_i$ 'i regülasyonunu ve kontraktiliteyi etkilemektedir. Kısa süreli uygulamada görülen bu etkinin kronik uygulamalarda ne gibi sonuçlara yol açacağını kesin olarak söyleyebilmek için yeni çalışmalar yapılması gerekmektedir. Yapılacak çalışmalar önemlidir, çünkü mevcut veriler bu yolağın özellikle kardiyovasküler hastalıklardaki önemi göz önünde bulundurulduğunda bitkilerde yüksek miktarda bulunan EA'nın kardiyovasküler hastalıklarda tedavi edici, düzeltici ve koruyucu özelliğe sahip olan bir molekül olabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla muhtemel terapötik potansiyelini değerlendirmek için fizyolojik ve patolojik koşullarda gerçekleştirilecek deneyler büyük önem taşımaktadır.

SONUÇLAR

Çalışmamızda fenolik bir bileşik olan EA'nın Ca^{2+} akımlarına ve kardiyak kontraktiliteye etkisi araştırılmıştır.

Ellagik asidin Ca^{2+} akımlarını doz bağımlı azalttığı görülmüştür. Öte yandan EA, LTCC inaktivasyon ve reaktivasyon kinetiklerini ise etkilememiştir. Ellagik asidin AS inhibitörü varlığına rağmen azaltıcı etkisini göstermesi Ca^{2+} akımlarını β -adrenerjik sistem aracılığıyla baskılamadığını göstermektedir. Antioksidan varlığında EA azaltıcı etkisini sürdürmüş ve böylece etki yolağının oksidan-antioksidan üzerinden olmadığı kanaatine varılmıştır. İlginç bir şekilde NOS inhibisyonu uygulandığında EA'nın azaltıcı etkisinin ortadan kalktığı görülmüştür. Benzer şekilde GS inhibisyonu yapıldığında da EA'nın azaltıcı etkisinin olmadığı görülmüş, böylece etki mekanizmasının NOS-GS-cGMP üzerinden olduğu kanısına ulaşılmıştır.

DeneySEL veriler EA'nın doz bağımlı fraksiyonel kısaltmayı azaltarak negatif inotropik etkisi olduğunu göstermiştir. Öte yandan EA ventrikül miyositlerinin AP repolarizasyon sürelerini anlamlı olarak uzatarak, potasyum akımlarına da etki edebileceğini göstermiştir.

Özetle elde ettiğimiz bulguların ışığında EA'nın doz bağımlı olarak Ca^{2+} akımlarını ve fraksiyonel kısaltmayı azalttığı, AP sürelerini ise uzattığı görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Khanbabae K, van Ree T (2001) Tannins: classification and definition. *Nat Prod Rep* 18: 641-649
2. Vattem DA, Ghaedian R, Shetty K (2005) Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. *Asia Pac J Clin Nutr* 14: 120-130
3. Costantino L, Albasini A, Rastelli G, Benvenuti S (1992) Activity of polyphenolic crude extracts as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase. *Planta Med* 58: 342-344.
4. Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Mykkänen HM, Törrönen AR (2000) Influence of domestic processing and storage on flavonol contents in berries. *J Agric Food Chem* 48: 2960-2965
5. Randhir R, Lin YT, Shetty K (2004) Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pac J Clin Nutr* 13: 295-307
6. Priyadarsini KI, Khopde SM, Mohan H (2002) Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. *J Agric Food Chem* 50: 2200-2206.
7. Rettig MB, Heber D, An J, Seeram NP, Klatter T, Beldegrun A, Moro A, Henning SM, Mo D, Aronson WJ, Pantuck A (2008) Pomegranate extract inhibits androgen-independent prostate cancer growth through a nuclear factor-kappaB-dependent mechanism. *Mol Cancer Ther* 7: 2662-2671.
8. Kaul A, Khanduja KL (1999) Plant polyphenols inhibit benzoyl peroxide-induced superoxide anion radical production and diacylglyceride formation in murine peritoneal macrophages. *Nutr Cancer* 35: 207-211.
9. Zhang Z, Hamilton SM, Stewart C, Strother A, Teel RW (1993) Inhibition of liver microsomal cytochrome P450 activity and metabolism of the tobacco-specific nitrosamine NNK by capsaicin and ellagic acid. *Anticancer Res* 13: 2341-2346
10. Barch DH, Rundhaugen LM, Pillay NS (1995) Ellagic acid induces transcription of the rat glutathione S-transferase-Ya gene. *Carcinogenesis* 16: 665-668
11. Dikmen M, Ozturk N, Ozturk Y (2011) The antioxidant potency of *Punica granatum* L. Fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer. *J Med Food* 14: 1638-1646.
12. Lin SS, Hung CF, Tyan YS, Yang CC, Hsia TC, Yang MD, Chung JG (2001) Ellagic acid inhibits arylamine N-acetyltransferase activity and DNA adduct formation in human bladder tumor cell lines. *Urol Res* 29: 371-376

13. Mari M, Darlin Quine S (2011) Pharmacodynamics of ellagic acid on cardiac troponin-T, lysosomal enzymes and membrane bound ATPases: mechanistic clues from biochemical, cytokine and in vitro studies. *Chem Biol Interact* 193: 154-161.
14. Mari Kannan M, Darlin Quine S (2012) Mechanistic clues in the protective effect of ellagic acid against apoptosis and decreased mitochondrial respiratory enzyme activities in myocardial infarcted rats. *Cardiovasc Toxicol* 12: 56-63.
15. Kannan MM, Quine SD (2013) Ellagic acid inhibits cardiac arrhythmias, hypertrophy and hyperlipidaemia during myocardial infarction in rats. *Metabolism* 62: 52-61.
16. Gilski DJ, Borkenhagen B (2005) Risk evaluation in action for cardiovascular health. *Crit Care Nurse* 25: 26-28, 30-27
17. Götz C, Montenarh M (1996) p53: DNA damage, DNA repair, and apoptosis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 127: 65-95
18. Dröge W (2002) Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol* 37: 1333-1345
19. Rice-Evans CA, Sampson J, Bramley PM, Holloway DE (1997) Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo? *Free Radic Res* 26: 381-398
20. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32: 595-603
21. Mitscher LA, Telikepalli H, McGhee E, Shankel DM (1996) Natural antimutagenic agents. *Mutat Res* 350: 143-152
22. Yamada J, Tomita Y (1996) Antimutagenic activity of caffeic acid and related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* 60: 328-329
23. Uenobe F, Nakamura S, Miyazawa M (1997) Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1. *Mutat Res* 373: 197-200
24. Kuroda Y, Inoue T (1988) Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria. *Mutat Res* 202: 387-391
25. Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56: 317-333
26. Ferrières J (2004) The French paradox: lessons for other countries. *Heart* 90: 107-111
27. Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE (1993) Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 341: 1103-1104
28. Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE, Shen CP, Phan SA, Ligon GF, Perry CA (1995) Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am J Pathol* 147: 278-292
29. Muldoon MF, Kritchevsky SB (1996) Flavonoids and heart disease. *BMJ* 312: 458-459
30. Banihani S, Swedan S, Alguraan Z (2013) Pomegranate and type 2 diabetes. *Nutr Res* 33: 341-348.

31. McCue P, Shetty K (2004) Health benefits of soy isoflavonoids and strategies for enhancement: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44: 361-367.
32. Quideau S, (1996) Ellagitannin Chemistry. *Chem Rev* 96: 475-504
33. Bakkalbaşı E, Menteş O, Artik N (2009) Food ellagitannins-occurrence, effects of processing and storage. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49: 283-298.
34. Haslam E (1996) Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod* 59: 205-215.
35. Niemetz R, Gross GG (2005) Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry* 66: 2001-2011.
36. Haslam E (2007) Vegetable tannins - lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry* 68: 2713-2721.
37. Deshpande SS, Cheryan M, Salunkhe DK (1986) Tannin analysis of food products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 24: 401-449.
38. Lei Z, Jervis J, Helm RF (2001) Use of methanolysis for the determination of total ellagic and gallic acid contents of wood and food products. *J Agric Food Chem* 49: 1165-1168
39. Marais JP, Mueller-Harvey I, Brandt EV, Ferreira D (2000) Polyphenols, condensed tannins, and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (Sainfoin). *J Agric Food Chem* 48: 3440-3447
40. Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y (2000) High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *J Chromatogr A* 896: 87-93
41. Mullen W, Yokota T, Lean ME, Crozier A (2003) Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSn. *Phytochemistry* 64: 617-624
42. Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130: 2073S-2085S
43. Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Heinonen IM, Mykkänen HM, Törrönen AR (1999) Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem* 47: 2274-2279
44. Kähkönen MP, Hopia AI, Heinonen M (2001) Berry phenolics and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 49: 4076-4082
45. Wada L, Ou B (2002) Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. *J Agric Food Chem* 50: 3495-3500
46. Lee JH, Talcott ST (2004) Fruit maturity and juice extraction influences ellagic acid derivatives and other antioxidant polyphenolics in muscadine grapes. *J Agric Food Chem* 52: 361-366.
47. Fukuda T, Ito H, Yoshida T (2004) Effect of the walnut polyphenol fraction on oxidative stress in type 2 diabetes mice. *Biofactors* 21: 251-253
48. Bushman BS, Phillips B, Isbell T, Ou B, Crane JM, Knapp SJ (2004) Chemical composition of caneberry (*Rubus* spp.) seeds and oils and their antioxidant potential. *J Agric Food Chem* 52: 7982-7987.

49. Soong YY, Barlow PJ (2005) Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1085: 270-277
50. Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y (2000) Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *J Chromatogr A* 891: 183-188
51. Marchesini AF, Williner MR, Mantovani VE, Robles JC, Goicoechea HC (2003) Simultaneous determination of naphazoline, diphenhydramine and phenylephrine in nasal solutions by capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 31: 39-46
52. Puech JL, Mertz C, Michon V, Le Guernevé C, Doco T, Hervé Du Penhoat C (1999) Evolution of castalagin and vescalagin in ethanol solutions. Identification of new derivatives. *J Agric Food Chem* 47: 2060-2066
53. Tabernero M, Serrano J, Saura-Calixto F (2007) Dietary fiber intake in two European diets with high (copenhagen, Denmark) and low (Murcia, Spain) colorectal cancer incidence. *J Agric Food Chem* 55: 9443-9449.
54. Koponen JM, Happonen AM, Mattila PH, Törrönen AR (2007) Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *J Agric Food Chem* 55: 1612-1619.
55. Radtke J, Linseisen J, Wolfram G (1998) [Phenolic acid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey]. *Z Ernährungswiss* 37: 190-197
56. Steinmetz KA, Potter JD (1996) Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 96: 1027-1039.
57. Doyle B, Griffiths LA (1980) The metabolism of ellagic acid in the rat. *Xenobiotica* 10: 247-256.
58. Teel RW, Martin RM (1988) Disposition of the plant phenol ellagic acid in the mouse following oral administration by gavage. *Xenobiotica* 18: 397-405.
59. Borges G, Mullen W, (2010) Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy. *J Agric Food Chem* 58: 3933-3939.
60. Selma MV, Espín JC, (2009) Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J Agric Food Chem* 57: 6485-6501
61. Cerdá B, Tomás-Barberán FA, Espín JC (2005) Metabolism of antioxidant and chemopreventive ellagitannins from strawberries, raspberries, walnuts, and oak-aged wine in humans: identification of biomarkers and individual variability. *J Agric Food Chem* 53: 227-235.
62. Riemersma RA, Rice-Evans CA, Tyrrell RM, Clifford MN, Lean ME (2001) Tea flavonoids and cardiovascular health. *QJM* 94: 277-282
63. Cerdá B, Espín JC, Parra S, Martínez P, Tomás-Barberán FA (2004) The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-

- dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *Eur J Nutr* 43: 205-220.
64. Siglin JC, Barch DH, Stoner GD (1995) Effects of dietary phenethyl isothiocyanate, ellagic acid, sulindac and calcium on the induction and progression of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis* 16: 1101-1106
 65. Kanai S, Okano H (1998) Mechanism of the protective effects of sumac gall extract and gallic acid on the progression of CC14-induced acute liver injury in rats. *Am J Chin Med* 26: 333-341.
 66. Singh K, Khanna AK, Chander R (1999) Hepatoprotective activity of ellagic acid against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Indian J Exp Biol* 37: 1025-1026
 67. Al-Kharusi N, Babiker HA, Al-Salam S, Waly MI, Nemmar A, Al-Lawati I, Yasin J, Beegam S, Ali BH (2013) Ellagic acid protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: a dose-dependent study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17: 299-310
 68. Saba, Khan S, Parvez S, Chaudhari B, Ahmad F, Anjum S, Raisuddin S (2013) Ellagic acid attenuates bleomycin and cyclophosphamide-induced pulmonary toxicity in Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 58C: 210-219.
 69. Uzar E, Alp H, Cevik MU, Fırat U, , Tufek A, Altun Y (2012) Ellagic acid attenuates oxidative stress on brain and sciatic nerve and improves histopathology of brain in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurol Sci* 33: 567-574.
 70. Lin MC, Yin MC (2013) Preventive Effects of Ellagic Acid Against Doxorubicin-Induced Cardio-Toxicity in Mice. *Cardiovasc Toxicol*.
 71. Andersson DC, Fauconnier J, Yamada T, Lacampagne A, Zhang SJ, Katz A, Westerblad H (2011) Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the β -adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. *J Physiol* 589: 1791-1801.
 72. Chen C, Shen G, Hebbar V, Hu R, Owuor ED, Kong AN (2003) Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis* 24: 1369-1378.
 73. Thresiamma KC, George J, Kuttan R (1998) Protective effect of curcumin, ellagic acid and bixin on radiation induced genotoxicity. *J Exp Clin Cancer Res* 17: 431-434
 74. Narayanan BA, Geoffroy O, Willingham MC, Re GG, Nixon DW (1999) p53/p21(WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. *Cancer Lett* 136: 215-221
 75. Whitley AC, Stoner GD, Darby MV, Walle T (2003) Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid--extensive binding to protein and DNA. *Biochem Pharmacol* 66: 907-915
 76. Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R (1995) Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J Nat Prod* 58: 217-225

77. Mertens-Talcott SU, Jilma-Stohlawetz P, Rios J, Hingorani L, Derendorf H (2006) Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *J Agric Food Chem* 54: 8956-8961.
78. Hassoun EA, Walter AC, Alsharif NZ, Stohs SJ (1997) Modulation of TCDD-induced fetotoxicity and oxidative stress in embryonic and placental tissues of C57BL/6J mice by vitamin E succinate and ellagic acid. *Toxicology* 124: 27-37.
79. Panchal SK, Ward L, Brown L (2013) Ellagic acid attenuates high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *Eur J Nutr* 52: 559-568.
80. Antipenko AY, Spielman AI, Kirchberger MA (1999) Interactions of 6-gingerol and ellagic acid with the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 227-234
81. Mathews S, Mathew SA, Gupta PK, Bhonde R, Totey S (2012) Glycosaminoglycans enhance osteoblast differentiation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*.
82. Lee WJ, Ou HC, Hsu WC, Chou MM, Tseng JJ, Hsu SL, Tsai KL, Sheu WH (2010) Ellagic acid inhibits oxidized LDL-mediated LOX-1 expression, ROS generation, and inflammation in human endothelial cells. *J Vasc Surg* 52: 1290-1300.
83. Ou HC, Lee WJ, Lee SD, Huang CY, Chiu TH, Tsai KL, Hsu WC, Sheu WH (2010) Ellagic acid protects endothelial cells from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by modulating the PI3K/Akt/eNOS pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 248: 134-143.
84. Kuo MY, Ou HC, Lee WJ, Kuo WW, Hwang LL, Song TY, Huang CY, Chiu TH, Tsai KL, Tsai CS, Sheu WH (2011) Ellagic acid inhibits oxidized low-density lipoprotein (OxLDL)-induced metalloproteinase (MMP) expression by modulating the protein kinase C- α /extracellular signal-regulated kinase/peroxisome proliferator-activated receptor γ /nuclear factor- κ B (PKC- α /ERK/PPAR- γ /NF- κ B) signaling pathway in endothelial cells. *J Agric Food Chem* 59: 5100-5108.
85. Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198-205.
86. Fabiato A, Fabiato F (1979) Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol* 41: 473-484.
87. Spinale FG, Coker ML, Krombach SR, Mukherjee R, Hallak H, Houck WV, Clair MJ, Kribbs SB, Johnson LL, Peterson JT, Zile MR (1999) Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure : effects on left ventricular dimensions and function. *Circ Res* 85: 364-376
88. Reuter H (1967) The dependence of slow inward current in Purkinje fibres on the extracellular calcium-concentration. *J Physiol* 192: 479-492
89. Reuter H, Porzig H (1982) Beta-adrenergic actions on cardiac cell membranes. *Adv Myocardiol* 3: 87-93

90. Brum G, Flockerzi V, Hofmann F, Osterrieder W, Trautwein W (1983) Injection of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into isolated cardiac myocytes. *Pflugers Arch* 398: 147-154
91. Hartzell HC, Fischmeister R (1987) Effect of forskolin and acetylcholine on calcium current in single isolated cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 32: 639-645
92. Seddon M, Shah AM, Casadei B (2007) Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res* 75: 315-326.
93. Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM (2002) Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 416: 337-339.
94. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87: 315-424.
95. Ziolo MT, Kohr MJ, Wang H (2008) Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *J Mol Cell Cardiol* 45: 625-632.
96. Vila-Petroff MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollott SJ (1999) Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res* 84: 1020-1031
97. Khan SA, Hare JM (2003) The role of nitric oxide in the physiological regulation of Ca²⁺ cycling. *Curr Opin Drug Discov Devel* 6: 658-666
98. Takimoto E, Champion HC, Li M, Ren S, Rodriguez ER, Tavazzi B, Lazzarino G, Paolucci N, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA (2005) Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. *J Clin Invest* 115: 1221-1231.
99. Lerman A, Zeiher AM (2005) Endothelial function: cardiac events. *Circulation* 111: 363-368.
100. Ertl R, Jahnel U, Nawrath H, Carmeliet E, Vereecke J (1991) Differential electrophysiologic and inotropic effects of phenylephrine in atrial and ventricular heart muscle preparations from rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 344: 574-581
101. Reddy PA, Anandavalli TE, Anandaraj MP (1986) Calcium activated neutral proteases (milli- and micro-CANP) and endogenous CANP inhibitor of muscle in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Clin Chim Acta* 160: 281-288
102. Le Grand B, Deroubaix E, Couétil JP, Coraboeuf E (1992) Effects of atrionatriuretic factor on Ca²⁺ current and Cai-independent transient outward K⁺ current in human atrial cells. *Pflugers Arch* 421: 486-491
103. West GA, Isenberg G, (1986) Antagonism of forskolin effects by adenosine in isolated hearts and ventricular myocytes. *Am J Physiol* 250: H769-777
104. Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR (1997) Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 272: 23389-23397

105. Walsh KB, Kass RS (1991) Distinct voltage-dependent regulation of a heart-delayed IK by protein kinases A and C. *Am J Physiol* 261: C1081-1090
106. Döşemeci A, Dhallan RS, Cohen NM, Lederer WJ, Rogers TB (1988) Phorbol ester increases calcium current and simulates the effects of angiotensin II on cultured neonatal rat heart myocytes. *Circ Res* 62: 347-357
107. Ogura T, Shuba LM, McDonald TF (1999) L-type Ca²⁺ current in guinea pig ventricular myocytes treated with modulators of tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol* 276: H1724-1733
108. Zahradníková A, Minarovic I, (2007) Competitive and cooperative effects of Bay K8644 on the L-type calcium channel current inhibition by calcium channel antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 322: 638-645.
109. Xiao RP, Zhu W, Zheng M, Chakir K, Bond R, Lakatta EG, Cheng H (2004) Subtype-specific beta-adrenoceptor signaling pathways in the heart and their potential clinical implications. *Trends in pharmacological sciences* 25: 358-365.
110. Bidasee KR, Nallani K, Besch HR, Dincer UD (2003) Streptozotocin-induced diabetes increases disulfide bond formation on cardiac ryanodine receptor (RyR2). *J Pharmacol Exp Ther* 305: 989-998.
111. Li X, Li S, Xu Z, Anding P, Liu D, Roy SK, Rozanski GJ (2006) Redox control of K⁺ channel remodeling in rat ventricle. *J Mol Cell Cardiol* 40: 339-349.
112. Aggarwal NT, Makielski JC (2013) Redox control of cardiac excitability. *Antioxid Redox Signal* 18: 432-468.
113. Takimoto E, Champion HC, Belardi D, Moslehi J, Mongillo M, Mergia E, Montrose DC, Isoda T, Aufiero K, Zaccolo M, Dostmann WR, Smith CJ, Kass DA (2005) cGMP catabolism by phosphodiesterase 5A regulates cardiac adrenergic stimulation by NOS3-dependent mechanism. *Circ Res* 96: 100-109.
114. Takimoto E (2012) Cyclic GMP-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ J* 76: 1819-1825
115. Fischmeister R, Castro LR, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevicius J, Leroy J, Vandecasteele G (2006) Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* 99: 816-828.
116. Fotiou S, Fotiou D, Alamanou A, Deliconstantinos G (2010) Resveratrol activation of nitric oxide synthase in rabbit brain synaptosomes: singlet oxygen (¹O₂) formation as a causative factor of neurotoxicity. *In Vivo* 24: 49-53
117. Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Förstermann U (2002) Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 106: 1652-1658
118. Klinge CM, Wickramasinghe NS, Ivanova MM, Dougherty SM (2008) Resveratrol stimulates nitric oxide production by increasing estrogen receptor

- alpha-Src-caveolin-1 interaction and phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J* 22: 2185-2197.
119. Deng J, Liu W, Wang Y, Dong M, Zheng M, Liu J (2012) Polydatin modulates Ca²⁺ handling, excitation-contraction coupling and β -adrenergic signaling in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 53: 646-656.
 120. Zhang M, Takimoto E, Hsu S, Lee DI, Nagayama T, Danner T, Koitabashi N, Barth AS, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA (2010) Myocardial remodeling is controlled by myocyte-targeted gene regulation of phosphodiesterase type 5. *J Am Coll Cardiol* 56: 2021-2030.
 121. Lee DI, Vahebi S, Tocchetti CG, Barouch LA, Solaro RJ, Takimoto E, Kass DA (2010) PDE5A suppression of acute beta-adrenergic activation requires modulation of myocyte beta-3 signaling coupled to PKG-mediated troponin I phosphorylation. *Basic Res Cardiol* 105: 337-347.
 122. Borlaug BA, Melenovsky V, Marhin T, Fitzgerald P, Kass DA (2005) Sildenafil inhibits beta-adrenergic-stimulated cardiac contractility in humans. *Circulation* 112: 2642-2649.
 123. Shafer TJ, Bushnell PJ, Benignus VA, Woodward JJ (2005) Perturbation of voltage-sensitive Ca²⁺ channel function by volatile organic solvents. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 1109-1118.
 124. Vaquero M, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Tamargo J, Delpón E (2007) Effects of atorvastatin and simvastatin on atrial plateau currents. *J Mol Cell Cardiol* 42: 931-945.
 125. Cawley SM, Kolodziej S, Ichinose F, Brouckaert P, Buys ES, Bloch KD (2011) sGC α 1 mediates the negative inotropic effects of NO in cardiac myocytes independent of changes in calcium handling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H157-163.
 126. Layland J, Li JM, Shah AM (2002) Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *The Journal of physiology* 540: 457-467
 127. Wegener JW, Nawrath H, Wolfsgruber W, Kuhbandner S, Werner C, Hofmann F, Feil R (2002) cGMP-dependent protein kinase I mediates the negative inotropic effect of cGMP in the murine myocardium. *Circ Res* 90: 18-20
 128. Tsai EJ, Kass DA (2009) Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacology & therapeutics* 122: 216-238.
 129. Ayaz M, Ozdemir S, Ugur M, Vassort G, Turan B (2004) Effects of selenium on altered mechanical and electrical cardiac activities of diabetic rat. *Arch Biochem Biophys* 426: 83-90.
 130. Nerbonne JM, Kass RS (2005) Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 85: 1205-1253.
 131. Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E (2004) Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 62: 9-33.

132. Takimoto T, Morita S, Osa A, Abe K (2012) Tension pneumomediastinum in a patient with interstitial pneumonia. *Internal medicine* 51: 125
133. Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA (2005) Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nature medicine* 11: 214-222.
134. Guazzi M, Vicenzi M, Arena R, Guazzi MD (2011) PDE5 inhibition with sildenafil improves left ventricular diastolic function, cardiac geometry, and clinical status in patients with stable systolic heart failure: results of a 1-year, prospective, randomized, placebo-controlled study. *Circulation Heart failure* 4: 8-17.
135. Giannetta E, Isidori AM, Galea N, Carbone I, Mandosi E, Vizza CD, Naro F, Morano S, Fedele F, Lenzi A (2012) Chronic Inhibition of cGMP phosphodiesterase 5A improves diabetic cardiomyopathy: a randomized, controlled clinical trial using magnetic resonance imaging with myocardial tagging. *Circulation* 125: 2323-2333.
136. Kukreja RC, Salloum FN, Das A, Koka S, Ockaili RA, Xi L (2011) Emerging new uses of phosphodiesterase-5 inhibitors in cardiovascular diseases. *Experimental and clinical cardiology* 16: e30-35
137. Frantz S, Klaiber M, Baba HA, Oberwinkler H, Volker K, Gabetaner B, Bayer B, Abebetier M, Schuh K, Feil R, Hofmann F, Kuhn M (2011) Stress-dependent dilated cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of cyclic GMP-dependent protein kinase I. *European heart journal*.
138. Kass DA, Takimoto E (2010) Regulation and role of myocyte cyclic GMP-dependent protein kinase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: E98; author reply E99.
139. Gorbe A, Giricz Z, Szunyog A, Csont T, Burley DS, Baxter GF, Ferdinandy P (2010) Role of cGMP-PKG signaling in the protection of neonatal rat cardiac myocytes subjected to simulated ischemia/reoxygenation. *Basic research in cardiology* 105: 643-650.
140. Fiedler B, Feil R, Hofmann F, Willenbockel C, Drexler H, Smolenski A, Lohmann SM, Wollert KC (2006) cGMP-dependent protein kinase type I inhibits TAB1-p38 mitogen-activated protein kinase apoptosis signaling in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 281
141. Burley DS, Ferdinandy P, Baxter GF (2007) Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. *British journal of pharmacology* 152: 855-869

ÖZGEÇMİŞ

Yusuf OLGAR, 1987 yılında HATAY'ın Antakya ilçesinde dünyaya geldi. İlk, orta ve lise eğitimini Antakya'da tamamladı. Lise diplomasını 2004 yılında aldı. 2005 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandı. Ege Üniversitesinden 2010 yılında mezun olduktan sonra Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Yabancı dili İngilizce'dir.