



**KARDİYOMİYOSİTLERDE KSANTİN/KSANTİN OKSİDAZ İLE İNDÜKLENEN
STRESE KARŞI, FENOLİK BİTKİSEL BİLEŞİKLERİN ANTİOKSİDATİF,
ANTİ-İNFLAMATUVAR VE SİTOPROTEKTİF ETKİLERİNİN
İN VİTRO YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Namık ÖZBEK

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

NİSAN 2015

Namık ÖZBEK tarafından hazırlanan “Kardiyomiyositlerde Ksantin/Ksantin Oksidaz ile İndüklenen Strese Karşı, Fenolik Bitkisel Bileşiklerin Antioksidatif, Anti-inflamatuvar ve Sitoprotektif Etkilerinin İn Vitro Yöntemlerle Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/ OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Çimen KARASU

Farmakoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Başkan: Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Unvanı Adı SOYADI

Anabilim Dalı, Üniversite Adı

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi : .../.../.....

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiği onaylıyorum.

Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Namık ÖZBEK

.../.../2015

**KARDİYOMİYOSİTLERDE KSANTİN/KSANTİN OKSİDAZ İLE İNDÜKLENEN
STRESE KARŞI, FENOLİK BİTKİSEL BİLEŞİKLERİN ANTİOKSİDATİF,
ANTİ-İNFLAMATUVAR VE SİTOPROTEKTİF ETKİLERİNİN
İN VİTRO YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI
(Doktora Tezi)**

Namık ÖZBEK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nisan 2015

ÖZET

Hipoksi-yeniden oksijenlenme sürecinde kalpte ksantin oksidaz enziminin aktive olması sebebiyle güçlü oksidan süperoksit anyonu üretiminin arttığı gösterilmiştir. Süperoksit anyonu oluşturuca “ksantin/ksantin oksidaz ” sistemlerin kardiyomiyosit ölümünü tetiklediği ve iskemik kalp hastalıklarına zemin oluşturduğu bilinmektedir. X/XO’ın kardiyak etkilerini ve polifenolik bileşiklerin koruyucu özelliklerinin mekanizmalarını daha iyi anlayabilmek için, bu tezde X/XO ile indüklenen oksidatif stres modelinde, iki farklı zeytin yaprağı kuru ekstresinin ve zeytin yaprağı polifenolik bileşiklerinin (oleuropein, kersetin ve hidroksitirozol) hücre canlılığı, reaktif oksijen türevi (ROS) oluşumu ve sağkalım-ölüm süreçlerinde rol oynayan hücre içi sinyal proteinleri düzeyindeki etkilerini H9c2 kardiyomiyositlerde araştırdık. H9c2 hücrelerinin X/XO ile uyarılması ROS oluşumunu arttırdı (DCFDA deneyi) ve hücre canlılığını (MTT deneyi) inhibe etti. Her bir ekstrenin ve polifenolik bileşiklerin farklı konsantrasyonları ile ön inkübasyon, X/XO aracılı ROS oluşumunu ve hücre canlılığını anlamlı olarak inhibe etti. Western blot analizleri, MAPKAPK-2 ve p44/42-MAPK’ın fosforile formlarının ve cl-caspase-3 düzeylerinin X/XO muamelesi ile arttığını ve fosforile c-jun ve Hsp27’in düzeylerinin ise azaldığını gösterdi. Estreler, kersetin ve hidroksitirozol X/XO ile indüklenen p-MAPKAPK-2 ve cl-caspase-3 düzeylerini iyileştirdi. Oleuropein, X/XO ile indüklenen p-MAPKAPK-2 düzeylerini inhibe ederken, cl-caspase-3 düzeylerini anlamlı olarak etkilemedi. Hidroksitirozol p-c-Jun düzeylerinde X/XO ile oluşan azalmayı artırırken, Hsp27 ve p44/42-MAPK (ERK1/2)’nin fosforile formlarının indüksiyonuna neden oldu. Bu çalışma sonuç olarak oleuropein, hidroksitirozol ve kersetin içeriği yüksek polifenolik zeytin yaprağı ekstrelerinin, X/XO ile indüklenen oksidatif strese karşı hücre canlılığını iyileştirerek, ROS oluşumunu önleyerek ve sağkalım-ölüm süreçlerinde rol oynayan özgün proteinlerin fosforile formlarının ifadenme düzeylerini değiştirerek kardiyomiyosit hücrelerini koruduğunu göstermiştir.

Bilim Kodu : 1018.2
Anahtar Kelimeler : Zeytin yaprağı ve Extresi, hücre canlılığı, polifenoller, antioxidant, H9c2, kardiyomiyositler, quercetin, hidroksitirozol, ksantin/ ksantin oksidaz,
Sayfa Adedi : 86
Danışman : Prof. Dr. Çimen KARASU

RESEARCH ON ANTIOXIDATIVE AND CYTOPROTECTIVE EFFECTS OF PHENOLIC
ANTIOXIDANTS AGAINST XHANTINE/XHANTHINE OXIDASE-INDUCED
CELLULAR STRESS AND TOXICITY IN CARDIOMYOCYTE
CULTURES IN VITRO
(Ph.D. Thesis)

Namık ÖZBEK

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

April 2015

ABSTRACT

The superoxide anion generating xanthine/xanthine oxidase (X/XO) system has been shown to induce cardiomyocyte death, which is a hallmark of ischemic heart disease. To better understand the exact mechanism of the action of X/XO and the effects of polyphenols, in this thesis we investigated the molecular action mechanism (s) and involved signaling pathways in the treatment of X/XO-induced oxidative stress with two different olive leaf extract mixtures and olive leaf polyphenolic compounds, oleuropein, quercetin and hydroxytyrosol in cardiomyocyte cell line. The stimulation of H9c2 cells with X/XO evoked ROS generation and inhibited the viability of cells. The preincubation with each extract, oleuropein, quercetin or hydroxytyrosol partially improved the viability and completely inhibited the generation of intracellular ROS in X/XO exposed cells. Western blot analysis showed that X/XO led to an increase in p-MAPKAPK-2, phospho-p44/42-MAPK and cl-caspase-3, but a decrease in the phosphorylation of p-c-Jun and p-Hsp27. Preincubation with each extract, quercetin or hydroxytyrosol partially ameliorated p-MAPKAPK-2 and inhibited cl-caspase-3 induced by X/XO. Oleuropein while inhibited p-MAPKAPK-2, had no effect on cl-caspase-3 in X/XO exposed cells. Hydroxytyrosol also increased down regulation of a transcriptional target p-c-Jun and led to overexpression in a protective stress-sensitive protein phospho-p44/42-MAPK (ERK1/2) and p-Hsp27 in X/XO exposed cells. We concluded from the results of our experiments that olive leaf extracts including high polyphenol content with oleuropein, hydroxytyrosol and quercetin provide cardiomyocyte cell protection activity against X/XO-induced oxidative challenge through recovery and good maintenance of cell viability, inhibiting ROS production and modulation of signaling proteins related with cell survival and death.

Science Code : 1018.2

Key Words : Olea europaea L, cell viability, polyphenol, antioxidant, H9c2, cardiomyocytes, quercetin, hydroxytyrosol, H9c2 cardiomyocyte, xanthine/xanthine oxidase,

Page Number : 86

Supervisor : Prof. Dr. Çimen KARASU

TEŞEKKÜR

Farmakoloji eğitimimin her aşamasında yakın destek ve himayelerini gördüğüm gibi tez yazma aşamasında da güçlü ve tarifsiz yardımlarını her daim hissettiğim tez danışmanım Prof.Dr. Çimen KARASU'ya, Laboratuar çalışmalarımızda bilgi ve tecrübesiyle bize destek veren Dr. Volkan ERGİN'e, Laboratuarımız projelerinde görev alan ve çalışmalarımızda aynı laboratuvarı kullandığımız her alanda yakın destek ve ilgilerini gördüğüm değerli kardeşim Dr. Burcu BALI'ye, Laboratuar çalışmalarında son dönem çalışmalarımıza katılan ve destekleriyle önemli mesafeler aldığımız Doktora öğrencisi Zübeyir ELMAZOĞLU'na teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu meşakkatli dönemde de her zaman olduğu gibi destek ve ilgilerini gördüğüm hayatıma anlam katan değerli eşim ve çocuklarıma en kalbi şükranlarımı arz ediyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ARAŞTIRMALAR	3
2.1. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türevleri	3
2.2. Hücrede Redoks Homeostaz, (Oksidatif/Nitrozatif/Karbonil Stres)	6
2.3. Redoks Strese Karşı Endojen ve Ekzojen Antioksidan Savunma	12
2.4. Kardiyovasküler Patolojide Redoks Stresin Rolü ve Antioksidatif Yaklaşım	15
2.5. Bitkisel Polifenoller ve Etkileri	19
2.6. Zeytin Yaprığının Fenolik Bileşikleri ve Etkileri	25
2.7.Ksanti n(X)/Ksantin Oksidaz (XO)	29
3. YÖNTEM.....	33
3.1. Laboratuvar.....	33
Hücre Kültürü: H9c2 (Rat Kardiyomiyoblast)	33
3.3. Oksidatif Stresin Ksantin/Ksantin Oksidaz İle İndüklenmesi	33

3.4. Standart Ekstre, Fenolik Bileşikler ve Xo/X Uygulanması.....	34
3.5. Etkileri Test Edilen Redoks Düzenleyiciler	34
3.5.1. “Oleuropein”, ticari olarak temin edilmiştir.....	34
3.5.2. “Hydroxytyrosol”, ticari olarak temin edilmiştir.	34
3.5.3. “Quercetin”, ticari olarak temin edilmiştir.	34
3.5.4. Zeytin yaprağı ekstraları.....	34
3.6. Ölçümlenen Parametreler	35
3.6.1. Zeytin yaprağı ekstralarında total fenol miktarı	35
3.6.2. MTT (canlılık-sağkalım-viability)	36
3.6.3. DCFH-DA deneyi (Reaktif Oksijen Türevleri (ROS)nin oluşumu)	36
3.6.4. Western Blotlama yöntemi ile transkripsiyon faktörlerinin kantitasyonu	37
3.7. Deneylerde Kullanılan Reaktifler, Kimyasallar ve Sarf Malzemesi	40
3.8. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	41
3.9. İstatistiksel Analizler.....	42
4. BULGULAR	42
4.1. Ekstrelerin total fenol içeriği	43
4.2. H9c2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerine X/Xo İnkübasyonunun Etkileri	44
4.3. Ekstreler ve Polifenolik Bileşiklerin X/Xo Varlığında H9c2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkileri	45
4.4. H9c2 Hücrelerinde Ros Üretimi, Ekstreler ve Polifenolik Bileşiklerin X/Xo Varlığında Ros Düzeylerine Etkileri	46
4.5. H9c2 Hücrelerinde P-Mapkapk-2 Protein Düzeyleri: X/Xo, Ekstreler ve Polifenolik Bileşiklerin Etkileri	48

4.6. H9c2 Hücrelerinde Fosfo P44/P42-Mapk (Erk) Protein Düzeyleri: X/Xo, Ekstreler ve Polifenolik Bileşiklerin Etkileri.....	49
4.7. H9c2 Hücrelerinde P-C-Jun Protein Düzeyleri: X/Xo, Ekstreler ve Polifenolik Bileşiklerin Etkileri	50
4.8. H9c2 Hücrelerinde Cl-Kaspaz-3 Protein Düzeyleri: X/Xo, Ekstreler ve Polifenolik Bileşiklerin Etkileri	51
4.9. H9c2 Hücrelerinde P-Hsp 27 Protein Düzeyleri: X/Xo, Ekstreler ve Polifenolik Bileşiklerin Etkileri	52
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	85

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Paketleyici Jel İçeriği	38
Çizelge 3.2. Ayırıcı Jel İçeriği	39
Çizelge 3.3. Kullanılan primer ve sekonder antikorların dilüsyonları	39
Çizelge 3.4. Kimyasallar, solventler ve sarf malzemeler	40
Çizelge 3.4. Kimyasallar, solventler ve sarf malzemeler (Devamı).....	41
Çizelge 3.5. Cihazlar	41

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Radikal ve radikal olmayan başlıca Reaktif Oksijen Tür(ev)leri.....	4
Şekil 2.2. Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonları.....	5
Şekil 2.3. Hücrede ROS oluşturan enzimler ve süreçler	6
Şekil 2.4. Hücre Canlılığının Sürdürülmesinde Redoks Homeostaz ve Hormezis	7
Şekil 2.5. Oksidatif Stres Varlığında Peroksinitrit Oluşumu	9
Şekil 2.6. Karbonil Stres Oluşması ve Sonuçları	10
Şekil 2.7. Oksidatif/Nitrozatif/Karbonil Stres ve apoptoz ilişkisi.....	11
Şekil 2.8.Bozulmuş oksijen kullanılabilirliği sonucu hücrede oluşan redoks stres ile ilişkili hastalıklar	11
Şekil 2.9. Mitokondriyal ve sitoplasmik ROS atağının neden olduğu değişikliklerin mekanizmaları.....	16
Şekil 2.10.Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı	20
Şekil 2.11.Bitkisel fenoliklerin kategorizasyonu	20
Şekil 2.12.Polifenollerinin kardiyoprotektif özelliklerine aracılık eden vasküler-endotel etki mekanizmaları.....	23
Şekil 2.13.Fitofenollerin kardiyoprotektif etkilerine aracılık eden hücre içi mekanizmalar	24
Şekil 2.14.Zeytin yaprağında bulunan başlıca fenolik bileşikler	28
Şekil 2.15.Pankreas β -hücrelerine polifenolik bileşiklerin antiapoptotik etkilerinin mekanizması	29
Şekil 2.16.Zeytin yaprağından izole edilen polifenolik bileşiklerin karbonil strese karşı antiapoptotik ve protektif etkilerinin mekanizması	30
Şekil 2.17. Ksantin.	31
Şekil 2.18. Kardiyak iskemi/reperfüzyon hasarında, X/XO ile tetiklenen oksidatif stres ...	31
Şekil 4.1. Ext-1 (etanolik, ZEYEX®) ve Ext-2 (metanolik) ekstralarında saptanan total fenolik bileşik miktarı	43

Şekil	Sayfa
Şekil 4.2.X/XO varlığında farklı konsantrasyonlarda hücrelerde canlılığın konsantrasyona bağlı olarak azalması	44
Şekil 4.3. X/XO'ın hücre canlılığını inhibe edici etkisi üzerinde, ekstreler ve polifenolik bileşiklerin önleyici etkileri	46
Şekil 4.4. X/XO'ın hücre içi ROS üretimine etkisi ve ekstreler ve polifenolik bileşikler ile ön inkübasyonun X/XO ile indüklenmiş ROS düzeylerine etkiler	47
Şekil 4.5.Hücrelerde p-MAPKAPK-2 protein düzeyleri	48
Şekil 4.6.Hücrelerde p44/p42-MAPK protein düzeyleri, X/XO, ekstreler ve polifenolik bileşiklerin etkileri	49
Şekil 4.7. Hücrelerde p-c-Jun protein düzeyleri, X/XO ekstreler ve polifenolik bileşiklerin etkileri.....	50
Şekil 4.8. Hücrelerde cl-kaspaz-3 protein düzeyleri, X/XO ekstreler ve polifenolik bileşiklerin etkileri.....	51
Şekil 4.9. Hücrelerde p-Hsp 27 protein düzeyleri, X/XO ekstreler ve polifenolik bileşiklerin etkileri.....	52
Şekil 5.1. Polifenolik bileşiklerinin antiapoptotik, antiproliferatif ve kardiyomiyosit koruyucu etkilerinin mekanizmaları	59

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Atina'da basılan Tetrarahma bir zeytin ağacı ile dekore Attika kask ile Athena, zeytin dalı ve baykuş	26
Resim 2.2. Antik Zeytin ağacı ve zeytin işleme ünitesi	27
Resim 3.1. Zeytin yaprağı	34
Resim 4.1. Hücre canlılığı üzerine X/XO etkisinin mikroskopik görüntü	44
Resim 4.2. Ext-1, Ext-2 ile ön inkübasyonu takiben X/XO'ın inkübasyonu sonrasında hücre kültür ortamından alınan fotomikroskopik görüntü	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
°C	Derece celsius
dk	Dakika
mM	Milimolar
mL	Mililitre
K	Potasyum
µm	Mikrometre
µg	Mikrogram
mg	Miligram
nm	Nanometre
µM	Mikromolar
O₂	Oksijen
Ca⁺⁺	Kalsiyum
Kısaltmalar	Açıklama
X	Ksantin
XO	Ksantin oksidaz
ROS	Reaktif Oksijen Substratı
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinucleotid

Kısaltmalar	Açıklama
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
SOD	Süperoksit Dismutaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RCCs	Reaktif Karbonil Bileşikleri
RNS	Reaktif Nitrojen Substratı
ALEs	Advanced Lipoxidation end Pruduct
AGEs	Advanced Glycoxidation end Pruduct
GPx	Glutatyon Peroksidaz
TNF	Tümör Nekrotizan Faktör
NO	Nitrik Oksit
PGI₂	Prosta Glandin I ₂
NOS	Nitrik Oksit Sentetaz
ET1	Endotelin-1
LDL	Low Dansiti Lipoprotein
DMSO	Dimethyl Sulfokside
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DCFH-DA	Diclorodihydrofluorescein diacetate
MAPK	Mitojen Aktivated Protein Kinaze
HRP	Horse radish peroksidaz

1. GİRİŞ

Kalp hastalıkları dünya genelinde önemli bir sağlık problemi olarak önemini korumaktadır. Kalp hücrelerinde metabolik stres yaratan faktörler, fizyolojiyi oluşturan sinyalizasyon basamaklarında bozulmaya, sonraki dönemde disfonksiyonlara ve ileri dönemde çoklu organ yetmezliği ile sonuçlanan komplikasyonlara neden olmaktadırlar. Kardiyak yetmezliklere bağlı hemodinamik bozukluklar morbidite ve erken ölümlerin önemli bir nedenidir. (Isfort ve diğerleri, 2014). Kardiyak komplikasyonlarından doğan sıkıntıları hafifletmeye yönelik tedavi stratejileri mevcut olmakla birlikte, komplikasyonların oluşmasına karşı önleyici-koruyucu ve/veya oluşmuş hasara karşı rejenerasyonu tetikleyen farmasötik yaklaşımlar neredeyse yoktur. Bu anlamda sentetik olmayan nutrasötikler, nutrasötikler dahilinde değerlendirilen fitokimyasallar, diğer metabolik ve dejeneratif hastalıklarda olduğu gibi kalp sağlığının sürdürülmesinde de yükselen eğilim olmaya devam etmektedirler. Kalp kası harabiyetinin hücresel mekanizmalarında kronik olarak onarılamayan “redoks stres”in neden olduğu bozulmuş sinyalizasyon dikkate alındığında, redoks homeostaz ile birlikte kardiyomiyosit metabolizmasını fizyolojik sınırlarda devam ettirebilecek ve hücre canlılığını modüle edebilecek yeni moleküller kardiyak ölümlerin geciktirilmesi konusunda geleceğe umut taşımaktadırlar (Minamino, 2010; Carlsson, Duker ve Jacobson, 2010; Liu ve diğerleri, 2013; Hastings ve diğerleri, 2014).

Bitkisel kaynaklı doğal ajanlar olarak zeytin yaprağı polifenolik bileşikler, hücreyi redoks hasara karşı koruyucu ve onarıcı özelliklerinden dolayı, son yıllarda, hem deneysel hem de klinik araştırmaların ilgi odağındadır (de Bock ve diğerleri, 2013; Lerman ve Lerman, 2013; Barbaro ve diğerleri, 2014). Laboratuvarımızda yapılan çalışmalar, zeytin yaprağı standardize ekstralarının ve buradan izole edilmiş fenolik yapıdaki bileşiklerin (oleuropein, hidroksitirozol, quercetin, luteolin, rutin, verbaskozid) pankreas beta-hücrelerini oksidan stres yaratan ve inflatuvar süreçleri tetikleyen uyarılara karşı metabolik parametreler, sinyal molekülleri ve apoptotik süreçlerin kontrolü düzeylerinde koruduğunu (Cumaoglu ve diğerleri, 2011 (a), (b), kardiyomiyositlerde karbonil stresle oluşturulmaya çalışılan hasar biçimlerini önlediğini (Bali ve diğerleri, 2014) ortaya koymuştur.

Bu projede, H9c2 sıçan kardiyomiyoblast hücre dizilerinde, zeytin yaprağı etanolik standardize kuru ekstresi ($\geq$ oleuropein) ve bu ekstrenin önemli fenolik bileşenleri olan oleuropein, quersetin ve hidrokstitirozol'ün hücre canlılığı, reaktif oksijen türevleri-metabolitleri (ROS) oluşumu, ayrıca hücre ölümü sürecinde inflamatuvar yolaklarla da ilişkili olarak, stres ile aktive olan transkripsiyon faktörü proteinlerin ifadelenmeleri üzerindeki etkileri, ortamda oksidatif stres oluşturan ksantin oksidaz (XO) /ksantin varlığında araştırılmış ve elde edilen bulgular birbirleriyle kıyaslanmıştır.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ARAŞTIRMALAR

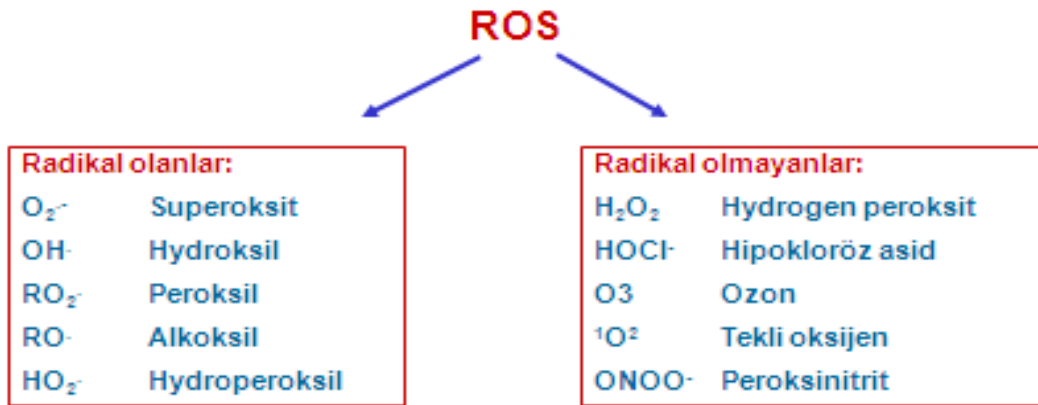
2.1. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türevleri

Kimyada serbest radikaller eşleşmemiş elektronu olan atom, molekül veya iyonlardır. Orbitalerde eşleşmemiş elektronlar son derece reaktiftirler, biyokimya ve doğadaki diğer kimyasal süreçlerin asıl oyuncularını olarak önemlidirler. Pek çok biyolojik süreci düzenleyen radikaller ile serbest radikaller güvenilir kaynaklarda eş anlamlı olarak kullanılırlar (Cheeseman ve Slater, 1993; Halliwell, 2006).

Kimyada serbest radikaller, radikal eklemesi ve radikal substitusyonunda reaktif ara ürün olarak oluşurlar. Serbest radikaller içeren zincirleme tepkimeler başlıca üç ayrı sürece ayrılırlar: başlama, yayılma ve sonlanma. Aerobik hücrelerdeki serbest radikal biyokimyasında en önemli reaktanlar oksijen, oksijen türevleri (süperoksit, hidroksil gibi), hidrojen peroksit ve geçiş metalleridir (Cheeseman ve Slater, 1993). Oksijenin kısmi indirgenmesiyle oluşan singlet oksijen, süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali ve diğer aktive olmuş oksijen türleri, bir başka deyişle reaktif oksijen türevleri (ROS) (Şekil 2.1.) oldukça reaktiftirler, hücre içinde çok sayıda biyolojik molekülü oksitlerler ve "redoks sinyalizasyon"a katılırlar. Serbest radikaller ve ROSlar yarılanma ömrü çok kısa moleküllerdir, elektronları hücredeki diğer moleküllere iletip kararlı hale geçme eğilimindedirler. Oksijenli serbest radikallerin en önemlileri olan süperoksit ve hidroksil radikali indirgeyici şartlarda moleküler oksijenden meydana gelir (Dröge, 2002).

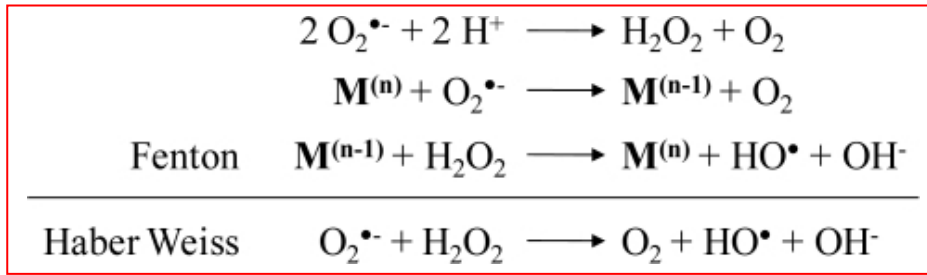
Oksijen elektron alarak en son suya indirgenir. Oksijene bir elektron eklenmesi sonucu süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot -}$), iki elektron eklenmesi sonucu hidrojen peroksit, üç elektron eklenmesi sonucu hidroksil radikali ve en son dört elektron eklenmesi ile su oluşur. Süperoksit radikali moleküler oksijenin indirgenmesinde ara basamak ürünü olarak açığa çıkar ve oluştuğu yerden uzağa diffüze olamaz. Doğal oksijen molekülünün başka bir molekülden elektron almış hali olan $O_2^{\cdot -}$ mitokondriyal elektron transfer zincirinde redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)'ın okside nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+)'a okside olması ile ve ayrıca pek çok oksidaz tarafından oluşturulur. $O_2^{\cdot -}$ genel olarak anyon şeklinde tarif edildiği halde, ortamın pH'sı ile ilişkili olarak katyon haline dönüşebilir. Bu durumda perhidroksi radikali ($HO_2^{\cdot}$) adını alır. Süperoksit, bir serbest radikal olmakla

birlikte, yarılanma ömrü kısa olduğu için, doğrudan toksik etkiler oluşturması fazla önem taşımaz ama H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olması nedeniyle toksik ROS'lara dönüşür. Doğal oksijen molekülü başka bir molekülden iki elektron alırsa peroksit oluşur. Peroksit iki H^+ ile birleşirse H_2O_2 oluşur. H_2O_2 süperoksitin SOD ile dismutasyonu sonucu veya spontan olarak da üretilebilmektedir. H_2O_2 , süperoksitin aksine membranları geçen, sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinir (Halliwell ve Gutteride, 1984; Valko ve diğerleri, 2007; Winterbourn, 2013).



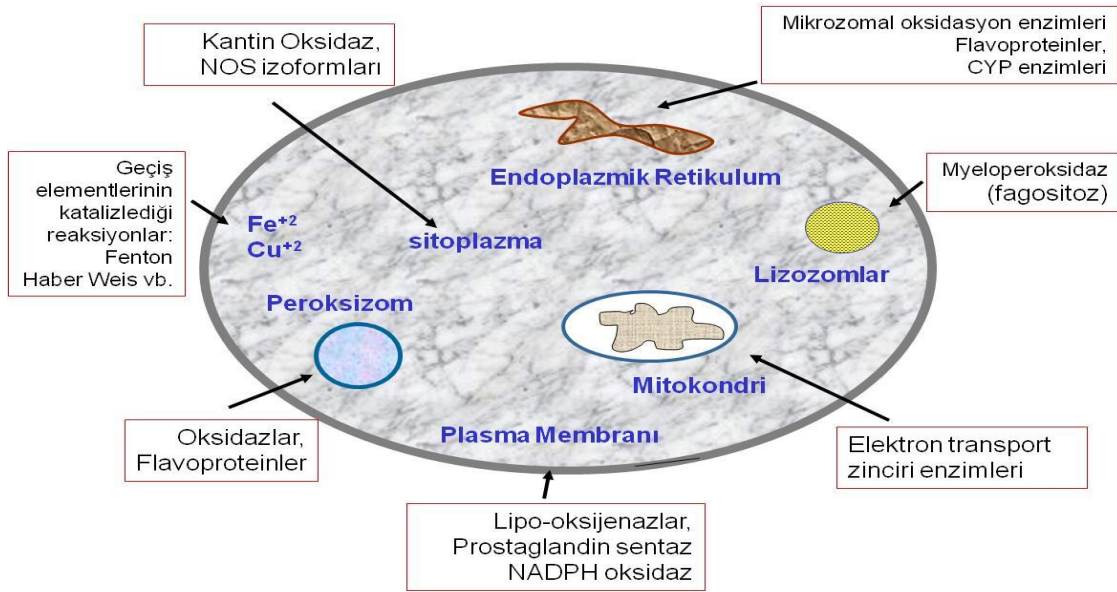
Şekil 2.1. Radikal ve radikal olmayan başlıca Reaktif Oksijen Tür(ev)leri (ROS)

Serbest radikal ve oksidatif stres teorisinin kökeni, 19. yüzyılın sonlarına dayanmaktadır. H. J. H. Fenton'un 1876 yılında, hidrojen peroksit ile Fe^{++} iyonlarının varlığında tartarik asitin oksidasyonunu keşfi bu yolda atılan ilk adım olarak bildirilmektedir (Fenton, 1876). 1927 tarihinde Binger ve diğerleri Oksijenin toksik olduğunu bildirmiş olmakla birlikte bu tarihlerde oksijenin serbest radikaller ile ilişkisi henüz tanımlanmamıştı. 1932'de Haber ve Weis, hidroksil radikalının, hidrojen peroksit ve süperoksit ile birlikte bir zincir reaksiyonu ile suya dönüştüğünü ortaya koymuştur (Haber ve Weiss, 1932). Günümüzde, redoks biyokimyada, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları hücrede oluşan ROSların çoğunun, sitotoksik hidroksil radikalının oluşumundan sorumlu tutulmaktadır (Winterbourn, 2013) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonları

Hidroksil, bilinen en reaktif radikaldır. Amino asitler, nükleik asitler, organik asitler, fosfolipidler ve şekerler ile kolayca reaksiyona girebilir. Tek atom halinde ve bir elektronu eksik olan oksijen ile H^+ (proton)un birleşmesinden oluşur. Hücrede ROS oluşturan başlıca yollar, mitokondrial elektron transport zinciri, heksoz monofosfat yolu, ksenobiotik metabolizması, fagositik hücrelerin aktivasyonu, biokimyasal degradasyon reaksiyonlarıdır. NADPH oksidaz(lar), ksantin oksidaz, lipo-oksijenaz, siklo-oksijenaz ve nitrik oksit sentaz endojen olarak ROS oluşumuna neden olan önemli enzimlerdir (Şekil 2.3). Öte yandan, İyonize ve ultraviyole radyasyona maruziyet, çevresel kirleticiler ve sentetik kimyasalların büyük bir çoğunluğu ROS oluştururlar. Özellikle çevresel kirleticiler ve okside olmuş besin kaynakları ROSları toksikolojik açıdan önemli kılar (Gutteridge ve Halliwell, 2000; Halliwell, 2006).

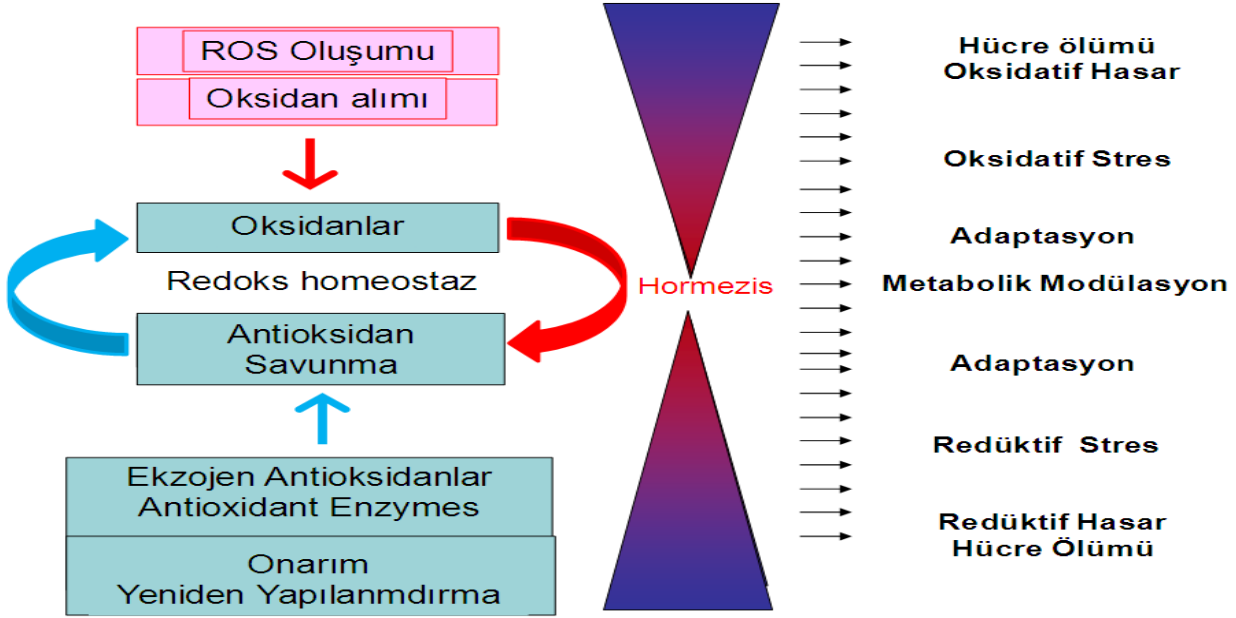


Şekil 2.3. Hücrede ROS oluşturan enzimler ve süreçler.

2.2. Hücrede Redoks Homeostaz, (Oksidatif/Nitrozatif/Karbonil Stres)

Reaktif oksijen tür(ev)leri (ROS), aerobik organizma olan insan vücudunda çok sayıda fizyolojik süreç dahilinde üretilmekte ve hücre içinde çeşitli sinyal iletimi ("sinyalizasyon", "signal transduction", "signaling") işlemlerine katılmaktadırlar. Normal şartlar altında, bir aerobik hücrenin endojen veya eksojen oksidantlara veya redüktanlara verdiği biyolojik yanıtlar "metabolik modülasyon" ve "adaptasyon" sınırlarında kalmalı ve oksidantların üretimi antioksidanlar tarafından dengelenmelidir. Eksojen veya endojen oksidantlara ve redüktanlara hücrenin verdiği yanıtların sınırları aslında "redoks homeostaz"ı belirleyen önemli faktörlerdir (Şekil 2.4). Hücrenin oksidan yada redüktan muameleye verdiği tepki dengelenme biçiminde olmalı, hücredeki oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları fizyolojik sınırları aşmamalı, hücreyi "stres"e ve "kaos"a sokacak boyutlara ulaşmamalıdır. Fizyolojik sınırların ötesinde "oksidasyon"a yada "redüksiyon"a zorlanan hücre "redoks stres" altındadır ve bir süre daha dengeye gelmek ve "redoks homeostaz"ı sürdürmek için uğraşsa bile ileriki dönemlerde kaosa girip G2 fazında bölünmesini durdurarak (senesens), erken "apoptoz"a yada diğer eliminasyon süreçlerine (otofaji) sürüklenir. Hormezis, hücrenin kısa ve ılımlı

(yada orta) şiddette maruz kaldığı oksidanlara yada redükthanlara karşı sağlıklı bir biçimde hayatta kalabilme uğraşısının bütünsel bir ifadesidir. (Dasari ve diğerleri, 2006; Ryter ve Choi, 2013).



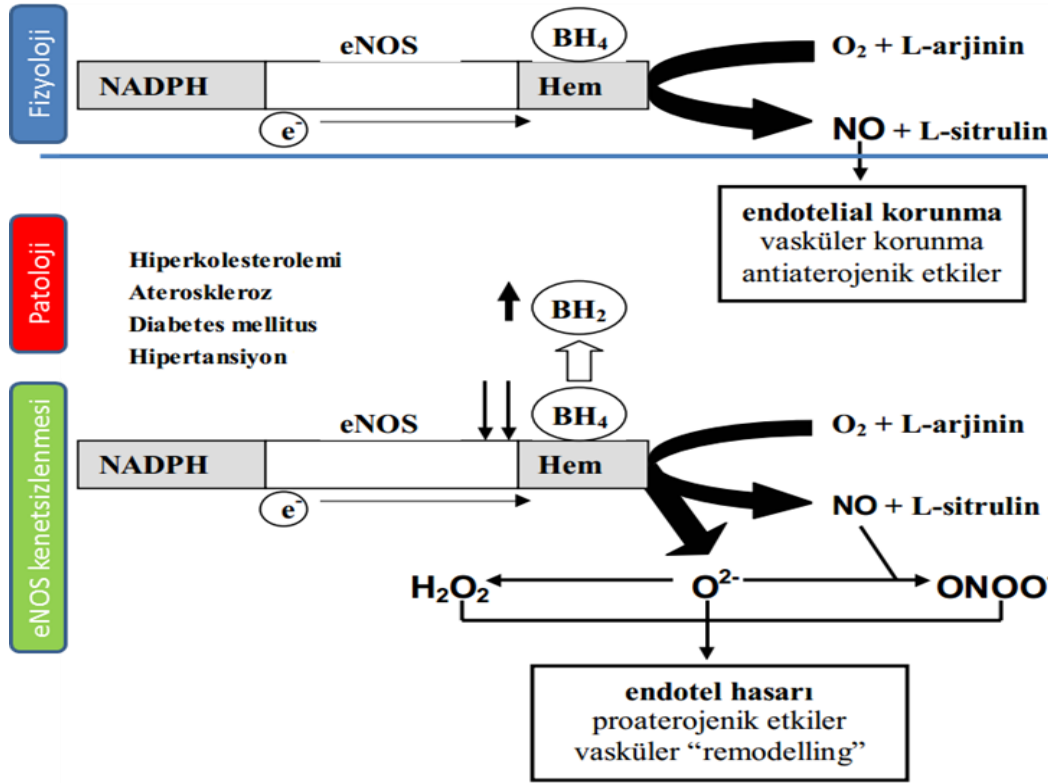
Şekil 2.4. Hücre Canlılığının Sürdürülmesinde Redoks Homeostaz ve Hormezis

Redoks homeostazın sürdürülebilir olması hücre canlılığını, proliferasyonunu, farklılaşmasını, fonksiyonlarını ve ömrünü belirler. Redoks homeostaz'daki bozulma nihayetinde hücreyi kaos'a, senesens'e ve ölüme (apoptoz) götürür. Hücre uzun süreli ve geri dönüştürülemeyen "redoks stres" altında ise erken apotoz ve erken yaşlanma görülür. Yaş alındıkça, hücrede ROS oluşturan metabolik olayların artması nedeniyle proteinlerde, DNA'da, membranlarda, organellerde modifikasyonların meydana gelmesi, moleküler hasarların oluşması, hasarlı komplekslerin-makromoleküllerin peroksizomlar ve lizozimler tarafından uzaklaştırılamaması, sonrasında çökmesi-birikmesi ve dokularda kalıcı bozuklukların oluşması, "serbest radikal teorisi"ne göre yaşlanmanın en önemli nedeni olarak bildirilmiştir. İlk kez Dr. Harman tarafından ortaya konan ve geliştirilen bu bilimsel yaklaşım (Harman, 2006), yıllar içerisinde "hücrede sinyalizasyon yıkılması" açıklamalarıyla zenginleşmiş ve araştırmaların odağına oturmuştur (Vina ve diğerleri, 2013; Piotrowska ve Bartnik, 2014; Dai ve diğerleri, 2014).

Oksidatif stres, genel olarak, hücredeki pro-oksidan ve anti-oksidan dengenin bozulması olarak tanımlanabilir. Oksidatif stres aracılı erken apoptoz, doku, organ ve organizma düzeylerinde erken yaşlanmanın önemli bir nedeni iken, aslında organizmayı hasarlı-atipik-zararlı hücre çoğalmasının sonuçlarına (örn: kansere, nörodejeneratif hastalıklara, kardiyovasküler bozukluklara vb) karşı ve (belki de) buna bağlı bedensel erken ölümlere karşı koruyan önemli evrimsel bir mekanizmadır (Rodier ve Campisi, 2011; Mao ve Reddy, 2011; Ergin ve diğerleri, 2013; Bielak-Zmijewska ve diğerleri, 2014).

ROS'lar, reaktif olmaları nedeniyle, lipidlere, şekerlere, amino asidlere ve proteinlere atak yaparlar. Bu atak normal sinyalizasyon ve metabolik adaptasyon ile sonuçlanmıyorsa, geri dönüştürülemez ve atak sonrası redoks homeostaz korunamıyorsa giderek toksik etkiler ortaya çıkmaya başlar: Membranlarda rol oynayan fonksiyonel ve yapısal proteinler oksitlenir, lipidlerde peroksidasyon artar, şekerlerde glio-oksidasyon reaksiyonları sonucu "Reaktif Karbonil Bileşikleri" (RCCs) meydana gelir ve sonrasında bu bileşikler proteinler ile çözülme-yen kompleksler oluştururlar.

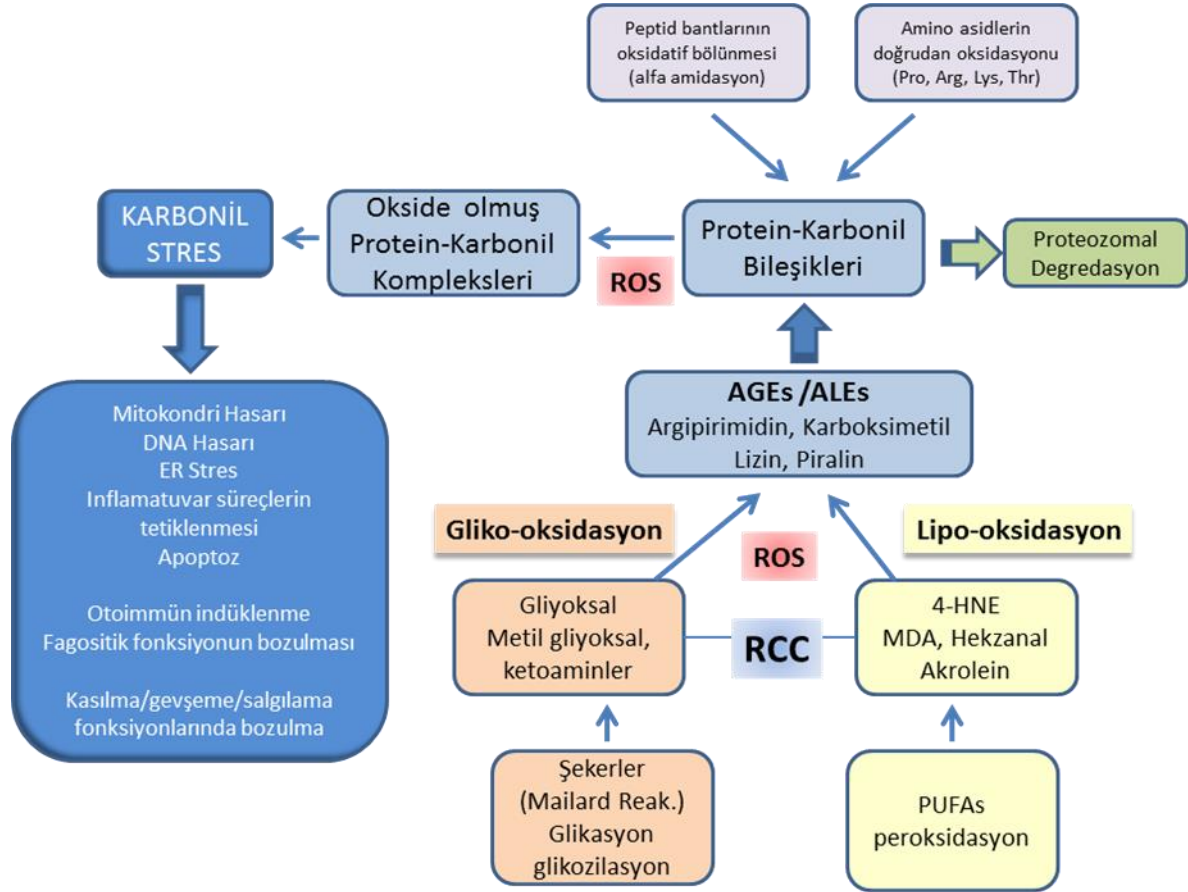
Reaktif oksijen tür(ev)leri (ROS) gibi reaktif nitrojen türevleri (RNS) de oldukça reaktif moleküllerdir ve çok sayıda biyolojik süreçte sinyal iletimi molekülleri olarak rol oynarlar. Örn: Nitrik oksit radikali ($\text{NO}\bullet$), süperoksit ile tepkimeye girerek peroksinitrit (ONOO^-) oluşturur. Peroksinitrit, önemli bir sinyalizasyon molekülü olmakla birlikte, fizyolojik olmayan konsantrasyonlarda sitotoksik etkilere neden olur (Valko ve diğerleri, 2007). ONOO^- , hücrede apoptotik süreçleri tetikler. eNOS kenetsizlenmesi durumunda daha fazla peroksinitrit üretilir (Şekil 2.5). Fizyolojik koşullarda eNOS proteini ile BH4 (tetrahidrobiopteridin) düzeyleri arasında bir denge vardır ve eNOS aktivasyonu NO ve L-sitrülin oluşturur. Oksidan stresin arttığı durumlarda, BH4 düzeyi azalırken eNOS'un aktivasyonu eNOS kenetsizlenmesi" ve NO yerine süperoksit oluşumuna neden olur (Kawashima ve Yokoyama, 2004).



Şekil 2.5. Oksidatif Stres Varlığında Peroksinitrit Oluşumu.

RCCs, endojen lipid peroksidasyonu ve karbonhidrat glikasyonu/ glikozilasyonu/ sırasında meydana gelirler. Bir başka deyişle, ileri glikasyon son ürünleri (AGEs) ve ileri lipid peroksidasyon son ürünleri (ALEs) 'in prekürsörleri olarak oluşurlar. AGE'ler, proteinler, lipoproteinler ve/veya nükleik asitlerde bulunan azotlu grupların, indirgeyici şekerlerin karbonil grupları ile nonenzimatik glikasyonu sonucu oluşan heterojen bileşiklerdir. AGEs ürünleri ilk kez Louis Camille Maillard tarafından 1912 yılında tanımlanmıştır. Enzimatik glikasyon ise glikozilasyon olarak adlandırılır. Reaktif dikarbonil prekürsörlerinin gliko-oksidadasyon ve/veya lipo-oksidadasyon ürünlerinin hücrelerde birikimi, "karbonil stres" ile sonuçlanır. Pentoizidin, argiprimidin, karboksimetil lizin, piralin, glukozpan, hidroimidazon, AGEs bileşikleridir. En önemlisi, karbonil bileşiklerinin proteinler ile yaptıkları komplekslerin çözünabilir nitelikte olmamalarıdır. Okside protein komplekslerinin düzeyi hücre yıkımının ve olası patolojilerin önemli bir göstergesidir. Örn. Lipofusin, AGEs/ALEs'lerin proteinler ile yaptığı ileri oksidadasyon ve çapraz bağlanma-katlanma kompleksi yapılarıdır ve artmış lipofusin cisimcikleri cilt yaşlanması, diyabetik kardiyomiyopati, Alzheimer's, maküler dejenerasyon, retinitis pigmentosa, böbrek yetmezliği

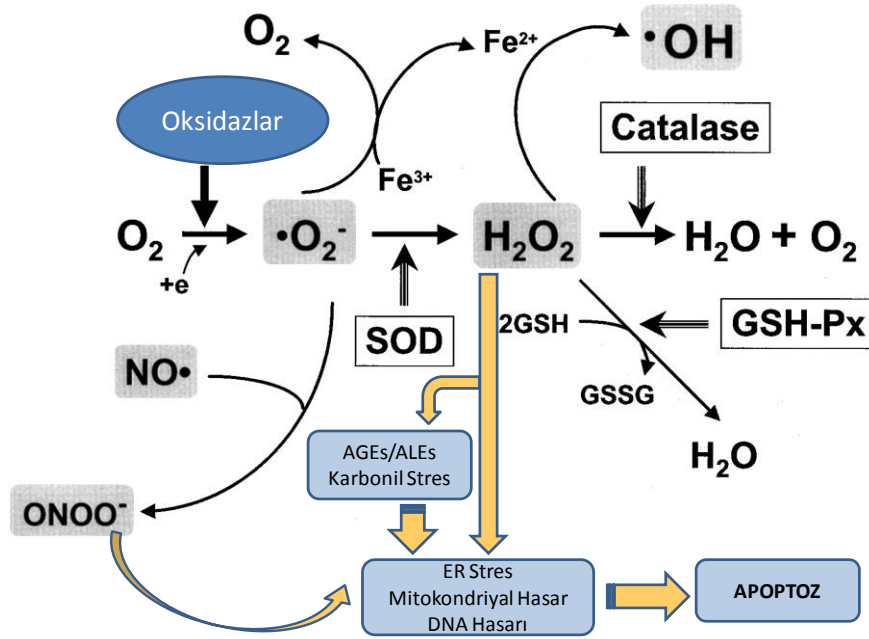
vb hastalıkların patogeneğinde yer almaktadır (Negre-Salvayre ve diğeri, 2008; Karasu, 2010; Bisceglia ve diğeri, 2011; Ergin ve diğeri, 2013; Nowak, 2013).



Şekil 2.6. Karbonil Stres: Oluşması ve Sonuçları

Peroksizomal ve lizozomal mekanizmalar ROS aracılı protein hasarlarının onarılması ve okside protein degradasyonu bakımından esas oyuncular ve redoks homeostazın sürdürülebilir olması, hastalık oluşturan patolojilerden korunma bakımından önemlidirler (Höhn ve diğeri, 2013).

ROS'lar, ayrıca amino asitler, proteinler ve DNA ile doğrudan etkileşmeye girerek de oksidasyona ve apoptoza neden olurlar (Şekil 2.6.). DNA'da kırılma ve mutasyonlara yol açarlar. ROS aracılı hasarlar inflamatuvar süreçlerin en önemli tetikleyicisidir. Özet olarak, ROS'ların yukarıda sayılan biyomoleküllerde yaptıkları geri dönüşümsüz değişiklikler çok sayıda patolojinin-hastalığın hücrel mekanizmasını oluşturur. (Nessar, 2005; Lei ve diğeri, 2014; Chaudhari ve diğeri, 2014). (Şekil 2.7.)'de mevcut durum şematize edilmiştir.



Şekil 2.7. Oksidatif/Nitrozatif/Karbonil Stres ve apoptoz ilişkisi



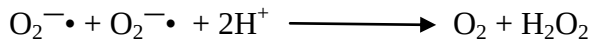
Şekil 2.8. Bozulmuş oksijen kullanılabilirliği sonucu hücrede oluşan redoks stres ile ilişkili hastalıklar.

2.3. Redoks Strese Karşı Endojen ve Ekzojen Antioksidan Savunma

Hücreler, oksi-radikallerin doğrudan ataklarına karşı antioksidan enzimler (endojen) ve redoks döngüyü destekleyen antioksidan mikroblesleyicileri (ekzojen) kullanır ve ayrıca yukarıda da değinildiği gibi, zarar görmüş yapı taşlarını hızlı ve kapsamlı bir şekilde onaran ve/veya değıştiren (degrede eden) sistemlere de (mikrozomal ve lizozomal sistemler) sahiptir. Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanları nötralize ederler ki bir başka deyimle etkisizleştirirler (Halliwell, 2006).

1. Scavenging (temizleme): Oksidanları zayıf, daha az zararlı bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından yapılır.
2. Quencher (baskılama) etkisi: Oksidanlara bir proton aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki ekzojen kaynaklı antioksidan mikroblesleyiciler yani vitaminler, flavonoidler vb tarafından yapılır.
3. Zincir koparma etkisi: Hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini zincir kırıcı antioksidanlardır.
4. Onarma etkisi (Örn: DNA onarım mekanizmaları) (Tang ve diğerleri, 2012).

Süperoksid Dismutaz (SOD), Mc Cord ve Fridovich tarafından 1968’de keşfedilmiştir. mitokondride (Mn-SOD), sitozolde (Cu-Zn SOD) lokalize olmuş formları bulunduğu gibi, bakır içeren ve plazmadaki süperoksit radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD’ formları vardır. Metalloprotein olan SOD bir süperoksit molekülünü O_2 molekülüne yükseltgeyip, diğer süperoksid molekülünü H_2O_2 ’e indirger.



Katalaz, Sumer ve Dounce tarafından 1937’de kristalize halde saflaştırılmış, yapısında Fe^{+3} bulunduran 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalizedir. SOD’ın oluşturduğu H_2O_2 ’i katalaz peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalar (Şekil 2.7). Genel bir yaklaşımla, düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 ’i ”glutasyon peroksidaz” parçalar, yüksek konsantrasyonlardakini ise katalaz dönüştürür.

İndirgenmiş glutasyon (GSH), E ve C vitaminlerinin radikal formlarının geri dönüşümünü sağlar ve glutasyon peroksidaz (GPx), glutasyon redüktaz (GR) ve glutasyon S-transferaz (GST)’nin katalizlediği reaksiyonlar için substrattır. GPx, H_2O_2 ve lipid peroksitleri temizler

ve selenyum'u ko-faktör olarak kullanır. GPx her birinde selenosistein içeren 4 alt birimden oluşur. Redükte glutatyonu yükseltirken H_2O_2 'i de suya çevirir ve böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur GR, okside olmuş glutatyonun (GSSG), glutatyon'a (GSH) dönüşümünü katalizler. Glutatyonun, GR ile indirgenmesi reaksiyonu NADPH kullanır. Heksoz monofosfat yolu NADPH üreten önemli bir yoldur. Diyabet gibi oksidatif stresin arttığı patolojilerde NADPH tüketimi vardır ve bu nedenle NADPH kullanan (Kulkarni ve diğerleri, 2014) glutatyonla bağımlı sistemin yaşlanma ile birlikte yetersiz kaldığı bildirilmiştir (Bao ve diğerleri, 2014).

Endojen antioksidan enzimlerin yanısıra endojen olarak üretilen antioksidan özellik gösteren başka moleküller de vardır. Örn: Seruloplazmin Fe^{+2} 'ni Fe^{+3} 'e ve okside- Fe^{+3} 'ün transferrine bağlanmasını kolaylaştırır. Seruloplazmin ferrokidaz aktivitesi gösterir. Transferrin ise H_2O_2 'den demir iyonu bağımlı hidroksil oluşumunu inhibe eder. Hidroksil oluşumunu inhibe eden transferin düzeylerinin diyabette azalmış olması diyabetteki oksidatif strese önemli katkı yaptığı bildirilmiştir. Ayrıca seruloplazmin ve transferin arasında sağlıklı kişilerde negatif bir korelasyon olduğu, ancak diyabette bu korelasyonun bozulduğu da vurgulanmaktadır (Ceriello, 2006). Melatonin lipofilik bir antioksidan olarak pineal bezden salgılanan tümör oluşumunun sınırlandırılması, immun sistemin düzenlenmesi, reproduktif fonksiyonların kontrolü gibi işlev gören bir hormondur. Kanser, nörodejeneratif hastalıklar gibi redoks stres ile karakterize çok sayıda patolojide etkileri ve etki mekanizmaları çalışılmış olan melatonin anti-inflamatuvar etkiler göstermektedir. (Bizzarri ve diğerleri, 2013; Arushanian ve Naumov, 2013). Klinik çalışmalar, ekzojen melatoninin, iskemi/reperfüzyon sonrası oluşan oksidatif hasara karşı koruyabildiğini göstermiştir (Yang ve diğerleri, 2014).

Ekzojen antioksidanlar genellikle mikrobeyinler dahilinde organizmaya alınır hücre membranında ve hücre içinde etkili olurlar. Bunlar özellikle C, E ve A vitaminleri, karotenoidler, tokoferoller, tokotrienoller, polifenoller, flavonlar, antosiyaninler, flavonoidler vb grublarda antioksidan etkileri kanıtlanmış fitokimyasallardır. Selenyum, bakır, çinko gibi eser elementler, esansiyel yağ asitleri ve esansiyel amino asitler de mikrobeyinler kapsamında ekzojen redoks modülatörler olarak değerlendirilmektedirler. Nutrigenomik alanındaki ilerlemeler, besinsel faktörleri ve antioksidan mikrobeyinleri sağlığın sürdürülebilir kılınması anlamında bilimsel araştırmaların odağına taşımıştır (Benzie ve Choi, 2013; Ergin ve diğerleri, 2013; Suredd ve diğerleri, 2014; Nuhu ve diğerleri, 2014; Mocchegiani ve

diğerleri, 2014). Laboratuvarımızda Prof. Karasu tarafından yürütölen araştırmalarda, E vitamini (Karasu ve diğeri, 1995; 1997 a,b; Pekiner ve diğeri, 2002; Ulusu ve diğeri, 2003; Doğru-Pekiner ve diğeri, 2003; Demiryörek ve diğeri, 2004; Das-Evcimen ve diğeri, 2004; Güneş ve diğeri, 2005; Kyselova ve diğeri, 2005; Yölek ve diğeri, 2007; Skalska ve diğeri, 2008), A vitamini (Zobalı ve diğeri, 2002 a, b; Hünkar ve diğeri, 2002; Ceylan-Işık ve diğeri, 2007), alfa-lipoik asitin (Koçak ve diğeri, 2000; Koçak ve Karasu, 2002) ekzojen antioksidanlar olarak metabolik hastalık modellerinde ve diğeri in vitro çalışmalarda hücre ve farklı doku fonksiyonlarını koruyucu ve/veya restore edici etkileri kanıtlanmıştır.

Doğal mikroblesleyicilerin yanı sıra çok sayıda ilacın antioksidan etkileri olduğı yıllar içerisinde kanıtlanmıştır. Allopurinol ksantin oksidaz inhibitörü olduğı için ürik asit oluşumunu engelleyen ve hiperürisemi tedavisinde kullanılan bir antioksidandır. Hem ksantin oksidaz ve ksantin dehidrogenaz ,hipoksantini ksantine ve ksantini de ürik aside dönüştürür. Allopurinol'ün lipid peroksidasyonunu ve hemoglobin glikasyonunu azalttığı da bildirilmektedir (Boda, 2011; Miller ve diğeri, 2012). Pentoksifilin, ksantin oksidaz üzerine inhibitör etkisi olan ve periferik damar hastalıklarında kullanılan ksantin türevi bir ilaçtır. Hidrojen peroksid oluşumunu artıran yolakları modöle eder (Nasiri-Toosi ve diğeri, 2013). Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü antihipertansif bazı ilaçlar, statinler, antidiyabetik metformin'in terapötik etki mekanizmalarının temelinde antioksidatif etkileri de yer almaktadır (Sarath ve diğeri, 2014). Simvastatin ve fluvastatin ile, Prof. Karasu'nun yaptığı çalışmalar, bu bulguları desteklemektedir (Ceylan ve diğeri, 2003; 2004; Cumaoğlu ve diğeri, 2011). Antihiperlipidemik ilaç probukol de önemli bir antioksidandır (Karasu ve diğeri, 1995; Karasu, 1998).

Esansiyel aminoasitlerinin (Örn. Taurin) (Güz ve diğeri, 2007) ve esansiyel yağ asitlerinin (Örn. Alfa-linolenik asit) (Karasu ve diğeri, 1995; Ceylan-Işık ve diğeri, 2007) antioksidan özelliklerinden dolayı oksidatif doku ve organ hasarlarını önledikleri saptanmıştır (Saha ve Ghosh, 2012; Zhang ve diğeri, 2013).

İlginç olarak, antioksidanlar, oksidan olmayan ajanlarla indöklenen apoptoz modellerinde bile koruyucu etkiler göstermişlerdir (Buttke ve Sandstrom, 1994). Örneğini; TNF-alfa gibi sitokinler ile indöklenen apoptozis modelinde tiyoredoksin ve N-asetil sistein gibi

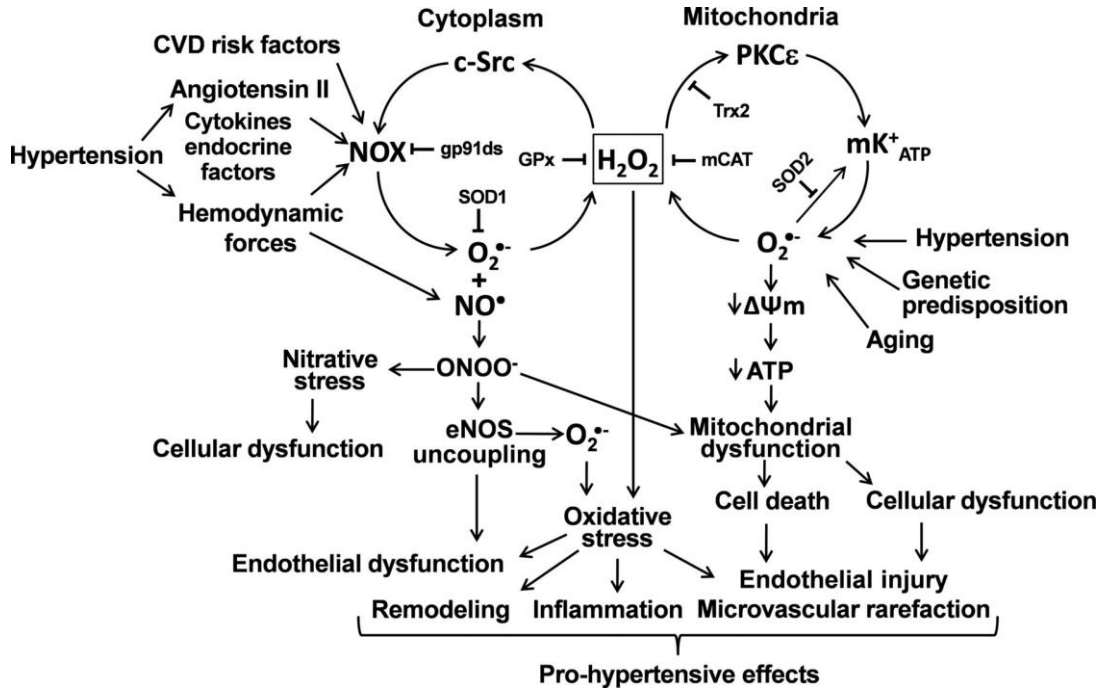
antioksidanlar sitoprotektif etkiler oluşturmışlardır çünkü sitokinler ile tetiklenen apoptotik süreçlerde hücrenin redoks kapasitesinin oksidasyon lehine kaydığı önemli bir bulgudur (Chang ve diğerleri, 1992; Malorni ve diğerleri, 1993; Matsuda ve diğerleri, 1991; Mayer ve diğerleri, 1994).

2.4. Kardiyovasküler Patolojide Redoks Stresin Rolü ve Antioksidatif Yaklaşım

Endotel disfonksiyonu:

Genel olarak vasküler tonus ve koroner arterlerin tonüsü, trombosit adezyonu, inflamasyon, fibrinoliz ve vasküler proliferasyon, endotel hücreleri tarafından salgılanan lokal mediyatörler (NO•, PGI₂, ET-1 gibi) tarafından düzenlenerek vasküler homeostaz korunur (Hirase ve Node, 2012). Endotel fonksiyonunun bozulması bu olayları olumsuz etkileyerek kardiyovasküler risk oluşturur (Bian ve diğerleri, 2008). Endotel disfonksiyonu, kontraktilite artışına ve hipertansiyona neden olur ve mikro- ve makro-anjiyopatinin en önemli nedenidir (Karasu, 1997; Karasu, 1998; Karasu, 2000; Karasu, 2010; Yannoutsos ve diğerleri, 2014). Son gelişmeler, oksidatif stresin vasküler disfonksiyonun majör nedeni olduğunu ve kronik stres durumunda endotel hücrelerinin koruyucu fenotiplerini kaybedip proinflamatuvar moleküller sentezleyerek erken apoptoza gittiklerini göstermiştir. Reaktif oksijen metabolitleri, NO•, inaktivasyonunu hızlandırarak vazomotor fonksiyonu bozarlar hatta superoksit'in ortamda yüksek olduğu durumlarda her ikisi hızlıca birleşerek toksik peroksinitrit oluşturur (ONOO-) (Karasu, 2000; Zöbalı ve diğerleri, 2001). Esansiyel hipertansiyonda gözlenen vasküler anormalliklerin temelinde oksidan stres aracılı endotel disfonksiyonu yatar (Sudano ve diğerleri, 2011; Schulz ve diğerleri, 2011). Endotele bağlı vasküler hasarda hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve monosit kemotaktik protein-1 önemli rol oynar. Sayılan faktörler ROS ve redoks stres varlığında endotel hücrelerinden büyüme faktörlerinin sekresyonunu hızlandırarak endotel hücre proliferasyonuna yol açar ve apoptozu hızlandırır. O nedenle son yıllarda, terapötik müdahale stratejileri olarak NO dönörleri, NO oluşturan ilaçlar, eNOS yeniden kenetleyicileri (recoupling), cGMP düzeyini artırılması, guanilat siklaz aktivatörleri'nin yanı sıra ROS düzeylerine, redoks dengesizliğe aşırı protein oksidasyonuna, tamir mekanizmalarının rejenerasyonuna olanak tanıyacak ajanların keşfine yönelinmiştir (Risbano ve Gladwin, 2013). Bu bağlamda NADPH oksidaz (NOX) inhibitörlerinin keşfi için yoğun araştırmalar

vardır (Dikalov ve Ungvari, 2012). NOX'lar ROS oluşumunu artırarak vasküler endotel hücrelerde ve kardiyak hücrelerde hasar ve disfonksiyona neden olmaktadır Şekil 2.9. (Dikalov ve Ungvari, 2013).



Şekil 2.9. Mitokondriyal ve sitoplasmik ROS atağının neden olduğu stres ve kardiyovasküler hastalık oluşturan hipertansif vasküler değişikliklerin mekanizmaları

Laboratuvarımızın yürüttüğü araştırmalarda, antioksidan etkili doğal ya da sentetik bileşiklerin, deneysel diyabet ile indüklenen oksidatif stres ve kolaylaştırılmış yaşlanma modelinde, endotel kaynaklı endojen etkili faktörlerin düzeyini koruyarak ya da restore ederek vasküler tonüsü ve kardiyovasküler fonksiyonları düzenledikleri in vivo ve in vitro çalışmalar ile ortaya konmuştur. Bu çalışmalarda, antioksidanlar, sadece vasküler kontraktile ve endotel fonksiyonlarını düzeltmekle kalmamış dokuda antioksidan enzim düzeyleri, metabolik parametreler ve ileri oksidasyon ürünleri düzeylerini de iyileştirmiştir (Karasu ve diğerleri, 1997 (a), (b); Karasu, 1998; Karasu, 1999; Koçak ve diğerleri, 2000; Koçak ve diğerleri, 2002; Zoba ve diğerleri, 2002; Ceylan-Işık ve diğerleri, 2007). Bu çalışmalar benzeri çok sayıda deneysel araştırma ile desteklenmiştir. Bazı yeni örnekler şu şekilde özetlenebilir: Bitkisel polifenolik antioksidan “curcumin”, kadmiyumla indüklenmiş oksidatif stres modelinde hipertansiyona karşı vasküler fonksiyonları korumuştur (Kukongviriyapan ve

diğerleri, 2014). Benzer biçimde “Resveratrol” endotele-bağımlı gevşemeleri arttırmaktadır (Gordish ve Beierwaltes, 2014). “Kateşin” deneysel diyabette arterlerde ortaya çıkan yapısal ve fonksiyonel bozuklukları düzeltmiştir (Bhardwaj ve diğerleri, 2014)

Ateroskleroz

Ateroskleroz için risk faktörleri olan hiperlipidemi, diyabet, hipertansiyon, sigara ve yaşlanma gibi etkenler, endotel, vasküler düz kas hücresi, kardiyomiyosit ve makrofajlarda ROS üretimini arttırmaları (Li ve diğerleri, 2014). Bu ROS’lar başlangıçta strese adaptasyon yanıtı olarak antioksidan enzim proteinlerinin ekspresyonlarını uyarsalar bile bir süre sonra aterogenez sürecini başlatan ve hatta ilerlemesinde rol alan birçok hücresel olayı başlatırlar. Bunlar arasında, adezyon molekülü ekspresyonunun artması, vasküler düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu, endotelde apoptoz, lipidlerin oksidasyonu (okside LDL), proteolitik matriks metalloproteinazların (MMP) aktivasyonu, inflamatuvar süreçlerin tetiklenmesi, ve vazomotor aktivitede değişiklikler yer almaktadır (Zhang ve diğerleri, 2011; van Rooy ve Pretorius, 2014). Bu süreçte, ksantin oksidaz, NAD(P)H oksidaz, nitrik oksit sentetaz (NOS) ve mitokondriyal enzimler ROS aracılı aterosklerotik değişikliklerin oluşmasında önemli rol oynar (Hulsman ve diğerleri, 2012). Koroner by-pas’lı hastalardan alınan insan koroner arterlerinde SOD gibi antioksidan enzim aktivitesinde azalmanın gösterilmiş olması, oksidatif stres-ateroskleroz-kardiyak yetmezlik ilişkisinin önemli kanıtlarıdır (Karahalil ve diğerleri, 2011; Kim ve diğerleri, 2013). Antioksidan desteğin aterosklerotik damar hastalıklarına bağlı kalp yetmezliklerinin riskini azaltacakları deneysel ve klinik gözlemlere bağlı olarak tartışılmaktadır (Otani ve diğerleri, 2013). Örneğin alfa-lipoik asid’in zincir kırıcı bir antioksidan olarak aterosklerotik kalp hastalıklarını önlediği, deneysel ve klinik çalışmalarda ortaya konmuştur (McNeilly ve diğerleri, 2011; Harding ve diğerleri, 2012).

Hipertansiyon

Vasküler endotelin kimyasal, hormonal ve hemodinamik değişikliklere olan yanıtı vasküler tonüsü belirler. Antioksidanlar, arteriyel hipertansiyonun tedavisinde diğer pek çok bileşimin yanında önerilmektedirler (Aschermann ve Jansa, 2014). Hipertansif hastalarda plazmada antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığı ve örneğin SOD mimetiklerin (MnTE-2-PyP) deney hayvanlarında vasküler yeniden biçimlenmeyi ve kan basıncını azalttığı bildirilmiştir

(Villegas ve diğerleri, 2013). Endotel hücrelerinde ROS aracılı hasarın önemli bir nedeni olarak son yıllarda gösterilen cytoplasmic Nox2 aktivasyonunu kontrol edebilen müdahale araçlarının hipertansiyon tedavisinde çığır açacağı belirtilmektedir (Nazarewicz ve diğerleri, 2013). Bu bağlamda atorvastatin'in NOX2 inhibitörü etkisiyle de hiperkolesterolemik aterosklerotik olayları kontrol ettiği ve kardiyak sağlığı koruduğu bildirilmiştir (Violi ve diğerleri, 2014). Öte yandan, mikrobisleyiciler kapsamında irdelenen çok sayıda antioksidanın (taurin, C,E,A vitamini, karotenoidler, tokoferoller, polifenoller, N-asetil sistein vb) hipertansiyona karşı koruduğu ve ilerlemesini kontrol ettiği vurgulanmaktadır (Ardalan ve Rafieian-Kopaei, 2013; Baradaran ve diğerleri, 2014).

Kalp

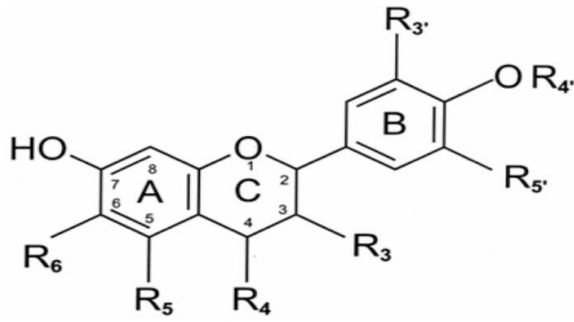
ROS yalnızca yukarıda açıklanan yollar üzerinden kardiyak yetmezliğe neden olmaz, ROS lar ve metabolitleri kardiyomiyositler üzerindeki doğrudan etkileriyle de kardiyak kontraktiletiyi ve kardiyomiyosit canlılığını etkilerler (Karasu C, 2010; Ergin ve diğerleri, 2013). Laboratuvarımızda yapılan deneysel araştırmalar A vitamini ve E vitamini ile ya da sentetik pridoinol antioksidanlar ile ROS aracılı kardiyak metabolizma ve/veya fonksiyon bozukluklarının önlendiği gösterilmiştir (Zobalı ve diğerleri, 2002; Pekiner ve diğerleri, 2002; Ceylan-Isik ve diğerleri, 2011). Oksidatif stresin etkilediği en önemli patolojilerden biri kalp yetersizliğidir. Kalp yetersizliği gelişen hastalarda SOD, CAT, GSH-Px ve E vitamini gibi miyokardiyal antioksidanlar azalırken, ROS ve oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir. İlaç tedavisiyle hemodinamik fonksiyonu düzelen hastalarda antioksidan rezervde artma, oksidatif strese azalma sağlandığı saptanmıştır İleri kalp yetersizliği olan hastalarda ve miyokard infarktüsü geçiren hastalarda miyokardın infarkt bölgelerinde miyositlerin ROS-aracılı (de Castro ve diğerleri, 2014; Wang ve diğerleri, 2014).

ROS rolünün doğrudan gösterildiği kardiyak sorunların başında reperfüzyon hasarı gelmektedir. Reperfüzyon hasarı, tıkanmış koroner arterin açılmasından sonra iskemik olan alana oksijenli kanın gelmesinin yarattığı olaylar zincirini takiben paradoksik olarak miyokard hücre hasarının artmasıdır. Bu olay kalpte geri dönüşebilir (miyokardiyal stunning) olabileceği gibi, geri dönülemez (miyokard infarktüsü) olayların başlangıcı da olabilir. Hücresel mekanizma olarak, kardiyomiyositlerde, koroner endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinde ve dolaşımdaki kan hücrelerinde artmış olan ROS oluşumu ve ROS-protein

etkileşmeleri sonucu gelişen konstriktör sinyalizasyonun hasar oluşumundan sorumlu başlıca mekanizma olduğu bildirilmektedir (Tullio ve diğerleri, 2011; Pagliaro ve Penna, 2014). (Şekil 2.8). Kardiyomiyositler etrafındaki redoks mikroçevre, sadece iskemi/reperfüzyon hasarında değil fakat kardiyoproteksiyonda da hayati rol oynamaktadır. Pre- ve post önkoşullamanın deney hayvanlarında infark alanında ciddi azalma gösterdiğini ortaya koyan çalışmalar bunu desteklemektedir (Tullio ve diğerleri, 2011; Pagliaro ve Penna, 2014). Ekzojen olarak H_2O_2 ile kardiyak perfüzyonun, reperfüzyon hasarının özellikleri olan hücresel K^+ kaybı, yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin azalması, hücre içi Ca^{++} artışı, miyosit kontraktilitesi ve gevşemesinin giderek azalması, metabolik fonksiyonun yavaşlaması ve aritmiler gibi bozukluklara neden olduğu gösterilmiştir (Lochner ve diğerleri, 2009). Farmakolojik çalışmalar, bozukluğun mekanizması olarak mitokondri ve sarkoplazmik retikulumda iyon transportunun bozulmasını öne sürmüştür (Gong ve diğerleri, 2012; Borchert ve diğerleri, 2013). Laboratuvar hayvanlarında yapılan çalışmalar, antioksidan enzim ya da antioksidan kimyasallar ile tedavinin iskemi/reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğu göstermiştir. Kükürtlü aminoasitler, N-asetil sistein, dimetiltiyöre gibi antioksidanlar, kalsiyum kanal blokörleri ve desferrioksamin gibi metal şelatörler ile yapılan çalışmaların sonuçları kardiyoprotektif etki bakımından olumlu bulunmuştur (Gökgöz ve diğerleri, 1992; Soncul ve diğerleri, 1992 (a), (b), (c); Keleş, 2002; Balková ve diğerleri, 2012).

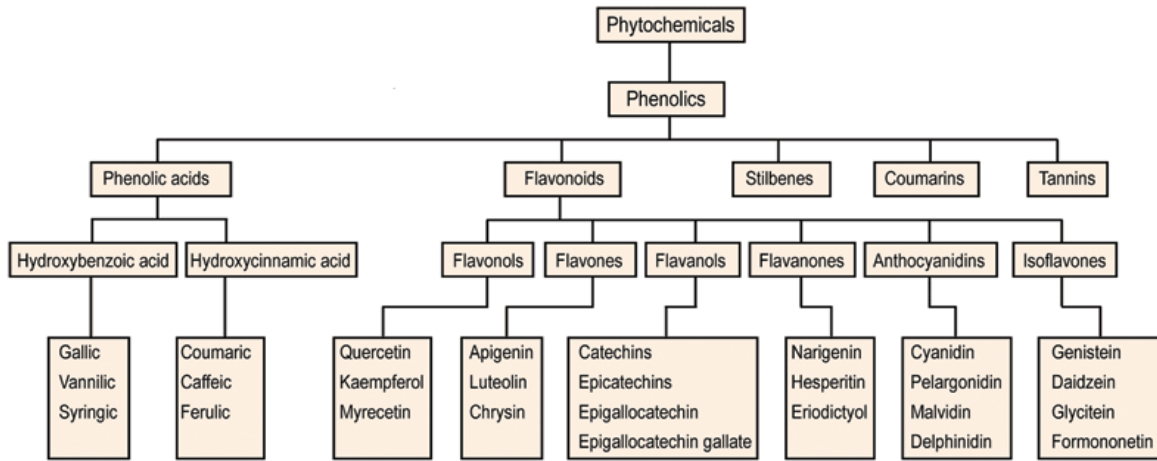
2.5. Bitkisel Polifenoller ve Etkileri

Fenolik moleküller aromatik halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren bileşiklerdir. En basit fenolik molekülün bir tane hidroksil grubu içeren benzen yani fenol olduğu ve diğer fenolik bileşiklerin bundan türediği bilinmektedir (Nacz ve Shahidi, 2007). Flavonoid yapısı Şekil 2.10.'da şematize edilmiştir. Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler basit fenoller ve polifenoller olmak üzere kabaca iki gruba ayrılmakla birlikte, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik maddeler hidroksibenzoik asitler, hidroksisinamik asitler ve flavonoidler olmak üzere üç kısımda incelenebilirler. Flavonoidler kimyasal olarak aglikan, glikozid veya metilenmiş şekillerde bulunabilirler. Temel olarak 6 gruba ayrılmaktadırlar. Flavononlar, flavonlar, flavonoller, flavanoller (kateşinler), izoflavonlar ve antosiyaninler (Dai ve Mumper, 2010). Polifenoller Şekil 2.11.'da kategorize edilmekle birlikte örneklerinin sayısı her geçen gün artmaktadır.



Şekil 2.10. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı

Bitkisel kökenli fenolik bileşikler özellikle gıda sanayinde, teknolojik olarak deri sanayinde ve son yıllarda ise diet bütünleyiciler, fonksiyonel gıdalar ve nutrasötikler dahilinde insan sağlığını geliştirme adına oldukça yaygın kullanım alanı bulmuşlardır (Magrone ve diğerleri, 2013). Flavonoidler en önemli antioksidan, serbest radikal tutucu ve zincir kırıcı redoks modülatörler olarak bilinmektedirler. Bitkisel sıvı yağlarda peroksidasyonu (acılaşmayı) önlemek amacıyla flavonoidler, yaprak-çiçek çayları, meyve ve çekirdek fenolikleri olarak halen yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Kumar ve Pandey, 2013).



Şekil 2.11. Bitkisel fenoliklerin kategorizasyonu.

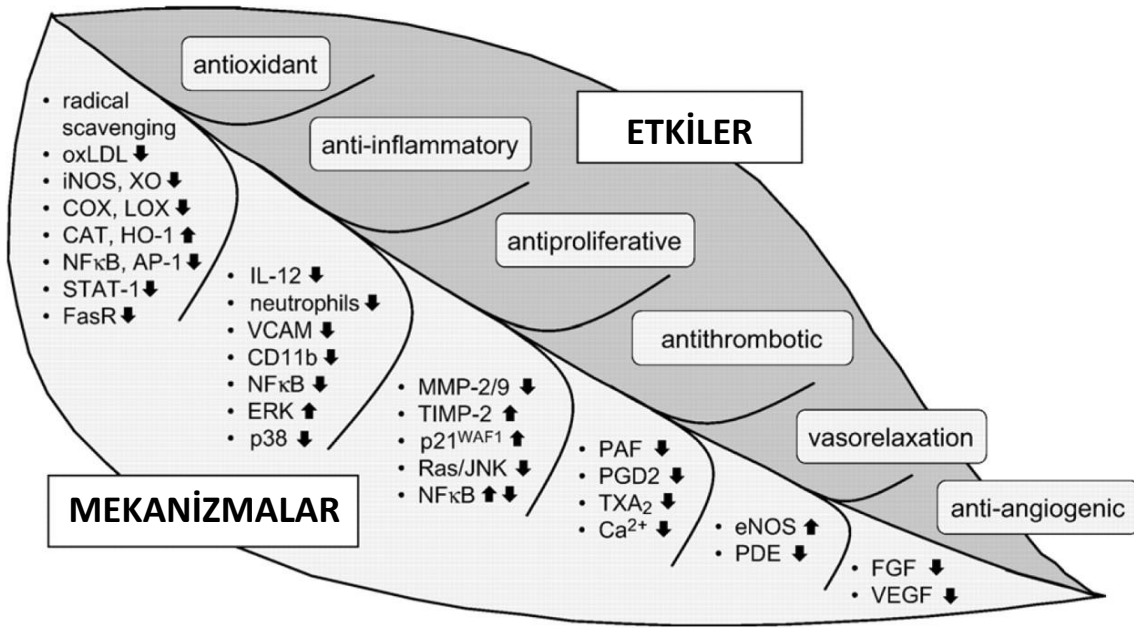
(kaynak: <http://www.landesbioscience.com/curie/images/chapters/Wahle1color.gif>)

İnsan sağlığını iyileştirmede bitkisel fenoliklerin kullanımı çok eskiye dayanmaktadır ve "Holistik Tıp"ta en önemli fitoterapötikler dahilinde incelenmektedirler. PubMed'e değişik anahtar sözcükler verilerek bakıldığında 4 bin civarında bilimsel makalenin bitkisel fenolik

bileşikler ile yapılan araştırmanın sonuçlarını yayımladıkları görülmektedir. Bitkilerin polifenolik bileşikler içeren kısımları (drog-droglar) halen kullanılmaya devam etmektedir (Aktarlar kapsamında). Fenolik ekstreler antimikrobiyal etkileri bakımından oldukça sık kullanılmışlardır (Kumar ve Pandey, 2013). Özellikle son 30 yıl süresince bilimsel yöntem, teknoloji ve anlayışta geline nokta bitkisel polifenoliklerin biyolojik etkilerinin kanıtlanmasına, hücresel etki mekanizmalarının aydınlatılmasına olanak sağlamış ve bu grup bileşiklerin insan sağlığına kanıta dayalı bir biçimde sunulmasının önünü açmıştır (Bahramsoltani ve diğerleri, 2014). Çeşitli bitkilerin polifenolik bileşik içeren drogları, daha önemlisi bu droglardan izole edilerek saflaştırılan polifenolik fitokimyasallar, kalp-damar hastalıkları, kanser, diyabet-obezite gibi kronik metabolik hastalıklar, hafıza ve bellek ile ilişkili nörodejeneratif bozukluklar ama aslında kronik inflamasyonla karakterize çok sayıda patolojiye karşı korunmada ve rejenerasyonda etkilidirler (Rodrigo ve diğerleri, 2014). Alzheimer hastalığına karşı koruyucu ve restore edici etkilerine ilişkin çalışmalar hızla artmakta ve ses getiren bulgulara ulaşılmaktadır (Walker ve diğerleri, 2014; Malar DS, Devi, 2014). Bitkisel polifenoller kondroprotektifdirler (Leong ve diğerleri, 2013); anti-trombotik etkiler gösterirler (Santhakumar ve diğerleri, 2014); anti-diyabetik etkileri iyi bilinmektedir (Babu ve diğerleri, 2013; Bahadoran ve diğerleri, 2013); solunum yollarında immün yanıtı kontrol ederek enfeksiyonlara direnci arttırırlar (Skinner ve diğerleri, 2013); katarakta karşı etkilidirler (Stefek ve Karasu, 2011); hepatoprotektif etkileri kanıtlanmıştır (Georgiev ve diğerleri, 2014).

Polifenollerin etkili oldukları patolojilerin oluşma ve ilerlemelerini sağlayan hücre içi mekanizmalara bakıldığında, hücresel metabolizmada redoks dengesizlikle ilişkili çoğunlukla oksidatif strese bağlı hasarların birincil rol oynadığı görülmektedir (Ergin ve diğerleri, 2013; Krausz ve diğerleri, 2014). Fenolik bileşikler bu anlamda hücre metabolizmasında rol alan redoks regülasyon faktörleri olarak davranmaktadırlar ve anti-AGE, karbonil-protein oksidasyonu inhibitörü etkileri insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinin temel mekanizmasını oluşturmaktadır (Ergin diğerleri, 2013; Boisard ve diğerleri, 2014). AGEs/ALEs inhibitörü ve aldoz redüktaz inhibitörü etkileri, fenolik antioksidanların diyabetik komplikasyonları önleyici etkilerinin mekanizmaları arasındadır (Karasu ve diğerleri, 2012; Ergin ve diğerleri, 2013 (a), (b)). Polifenolikler, hücre canlılığını kontrol eden ve apoptoza götüren mekanizmaları modüle ederek hücre sağlığının sürdürülebilir olmasına katkı sağlarlar (Giovannini ve Masella, 2012).

Polifenolikler, antioksidan olmaları sebebiyle anti-mutajenik ve anti-kanserojenik olarak da bilinmektedirler (Ajiboye ve diğerleri, 2014; Resende ve diğerleri, 2014). Polifenolik flavonoidlerin, askorbat ve glutatyon'un antiradikal döngüsüne katılarak, antioksidan "network"ü destekledikleri bulunmuştur. Yeni çalışmaların birinde, polifenolik bileşiklerden "quercetin"ın ve semi sentetik türevi "7-mono-O-(β -hydroxyethyl)-rutoside (monoHER)"ın antioksidan etkilerinin mekanizması redoks modülatörü şeklinde açıklanmıştır (Lemmens ve diğerleri, 2014). Epigallokateşingallat, genistein, apigenin, luteolin, quercetin, kampfero, kurkumin gibi polifenollerin antikanserojenik etkilerinin mekanizması olarak, antioksidan etkileri, ksantin oksidazı inhibe etmeleri, PI3-kinaz, Akt/Pkb, tirozin-kinaz, P1KC and MAP-kinaz sinyal yolları ile etkileşimleri, büyüme ve apoptotik faktörlerin transkripsiyonlarını değiştirmeleri öne sürülmüştür (Chen ve Dou, 2008). Bir flavonol olan quercetin, kanser hücrelerinde doza bağımlı olarak apoptozu etkilemekte ve yüksek konsantrasyonlarda apoptotik genleri aktive etmektedir (Tanagornmeatar ve diğerleri, 2014). Quercetin, bir başka fenolik arctigenin ile birlikte verildiğinde sinerjik etkileştirme göstererek prostat kanserinde anti-proliferatif etkinliği artmaktadır (Wang ve diğerleri, 2014). "Quercetin" + "cancer" olarak girildiğinde, PubMed'de 2000'e yakın makale görülmektedir. Fenolik maddelerin sağlıkla ilişkisinde toplam fenol miktarı veya flavonol, flavon gibi alt grupların miktarından çok bu maddelerin özgün türevleri ve her birinin oranının önemli olduğu belirtilmiştir (Cemeroğlu ve Cemeroğlu, 1998). Örn: Kakao polifenolleri ve genel olarak bitkisel polifenoller, LDL oksidasyonunu önledikleri için ateroskleroza karşı korumakta ve kalp hastalığı riskini azaltmaktadırlar (Baba ve diğerleri, 2007; Siasos ve diğerleri, 2013; Khan ve diğerleri, 2014). Kohort çalışmalar dahilinde de polifenollerin bu etkileri vurgulanmıştır (Kishimoto ve diğerleri, 2013). LDL oksidasyonunu ve inflamasyonu inhibe ettikleri, köpük hücresi oluşumunu ve makrofaj infiltrasyonunu önledikleri, anti-platelet, anti-aterosklerotik, anti-anjiyojenik aktivite gösterdikleri için kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu ve tedavi edici olmaları çok sayıda bitkide bulunan farklı polifenoliklerin ortak özellikleri olarak karşımıza çıkmaktadır (Kawai, 2011). Bunlar içerisinde nar polifenolikleri (punikalajin, elajik asit) (Sestili ve diğerleri, 2007; Daleprane ve diğerleri, 2012; Aviram ve Rosenblat, 2013; Shema-Didi ve diğerleri, 2014); lemon grass ve sitrus bioflavonoidleri (hesperidin, herseptin) (Campos ve diğerleri, 2014; Parhiz ve diğerleri, 2014), papatya polifenolleri (apigenin, quercetin) (Bijak ve diğerleri, 2013), üzüm (şarap) fenolleri (resveratrol) (Cui ve diğerleri, 2012; Yashiro ve diğerleri, 2012; Chiva-Blanch ve diğerleri, 2013), çay fenolik bileşikleri (kateşin, epigallokateşin) (Bornhoeft ve diğerleri, 2012) bunlar arasında sayılabilir.



Şekil 2.13. Fitofenollerin kardiyoprotektif etkilerine aracılık eden hücre içi mekanizmalar (Stangl ve diğerleri, 2007).

Yakın zamanda flavonoidler, diyetle alınan nükleer reseptör regülatörleri olarak tanımlanmaktadır (Avior ve diğerleri, 2013). Yapısal olarak nukleer reseptör ligandlarına benzemektedirler. Örn: Naringin ve hesperidin organizmaya meyveler ile alındıktan sonra aglikon türevleri olan naringenin ve hesperetine parçalanmakta ve bu halleri ile absorbe olmaktadır. Naringenin üzüme tadını veren bileşik olup yaygın olarak çalışılmaktadır. Diyabetik hayvan modellerinde kalori alımı veya yağ alımını değiştirmeden dislipidemi ortadan kaldırdığı gösterilmiştir. Düşük oranda ER reseptörlerine bağlandığı ve anti-östrojenik etki gösterdiği diğer yandan PI3K aktivasyonuna bağlı olarak apiloprotein B ve LDL protein düzeylerini düşürdüğü in vitro koşullarda gösterilmiştir. Ayrıca PPAR reseptörleri üzerinden yağ asidi oksidasyonunda görev alan genlerin transkripsiyonunu uyardığı, lipid ve kolesterol sentezinde görev alan genlerin ekspresyonunu inhibe ettiği, adiposit farklılaşması sırasında TLR2 (Toll-like receptors)'yi inhibe ettiği gösterilmiştir (Yoshida ve diğerleri, 2013). Hespertin hepatik HMGCR ekspresyonunu azaltır elma yapraklarında bulunan ve flavononlara benzeyen bir bileşik filoretin, glukozun hücre içine alımını inhibe etmektedir. Flavononlardan farklı olarak adiposit farklılaşmasını uyarmakta, ER cevap genlerinin ekspresyonunu değiştirmekte ve anti-inflamatuvar etkiler

oluşturmaktadırlar (Lee ve diğerleri, 2011; Yoshida ve diğerleri, 2012). Öte yandan, apigenin ve krisin ayrıca PPAR reseptör ekspresyonunu artırarak makrofaj hücrelerinde anti-inflamatuar etkinlik gösterirler. Polimetoksillenmiş flavonlar, nobiltein ve tangeretin, potent kolesterol düşürücü etkiye sahiptirler (Lee ve diğerleri, 2013). Tangeretin'in PPAR aktivasyonuna neden olarak lipid biyosentezini inhibe ettiği, yağ asidi oksidasyonunu uyardığı saptanmıştır (Kim ve diğerleri, 2012). Diğer yandan nobiltein'in PPAR ekspresyonunu azaltarak adipogenezi ve lipid birikimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Assini ve diğerleri, 2013).

Yeşil çay polifenolik bileşiklerinin, okside olmuş LDL'nin tetiklediği inflamatuvar faktör NFB aktivasyonunu HUVEC hücrelerinde inhibe ettiği gösterilmiştir (Wahyudi ve Sargowo, 2007). Elma kabuğundan izole edilen fenolik içeriğin (fenolik asitler, flavonol glikozitleri, flavan-3-ol, procyanidinler), antioksidan enzim aktivitesini iyileştirdikleri, LPS ile uyarılan TNF- α , IL-6 ve prostaglandin E2 miktarlarını azalttıkları, hücresel antioksidan savunmanın en önemli uyarıları arasında yer alan Nrf2 indüksiyonu yaptıkları ve mitokondriyal biogenезin master kontrolörü olan PGC-1 α düzeylerini arttırdıkları bildirilmiştir (Denis ve diğerleri, 2013).

Son yıllarda, ekzojen antioksidanların yanı sıra, oksidan atağa karşı hücrede endojen antioksidan savunmayı güçlendirecek genlerin aktivasyonunu sağlayan ajanların keşfi önem kazanmıştır. Bu anlamda bitkisel polifenollerin Nrf2, HO-1, γ -GCS ve FOXO3 genlerinin transkripsiyonunu arttırarak sitoprotektif oldukları bildirilmiştir (Mukherjee ve diğerleri, 2013; Liu ve diğerleri, 2014; Csiszár ve diğerleri, 2014; Bhullar ve Rupasinghe, 2015). Diyabetik kardiyomiyopatiye karşı Nrf2 aktivatörü olarak bitkisel polifenolikler gündeme oturmuştur (Chen ve diğerleri, 2014). Öte yandan semi sentetik polifenolik bileşiklerin avantajları nedeniyle insan sağlığına sunulmalarını sağlayacak araştırmalar da devam etmektedir (Stefek ve Karasu, 2011; Milackova ve diğerleri, 2013).

2.6. Zeytin Yaprağının Fenolik Bileşikleri ve Etkileri

Zeytin yaprağının insan sağlığının iyileştirilmesinde kullanıldığını işaret eden kaynaklar mitolojik çağa dek uzanmaktadır (<http://www.sabor-artesano.com/gb/olive-tree-mythology.htm>). Antik Yunan'da sikkelerin üzerinde dahi, bereket sembolü olarak, zeytin

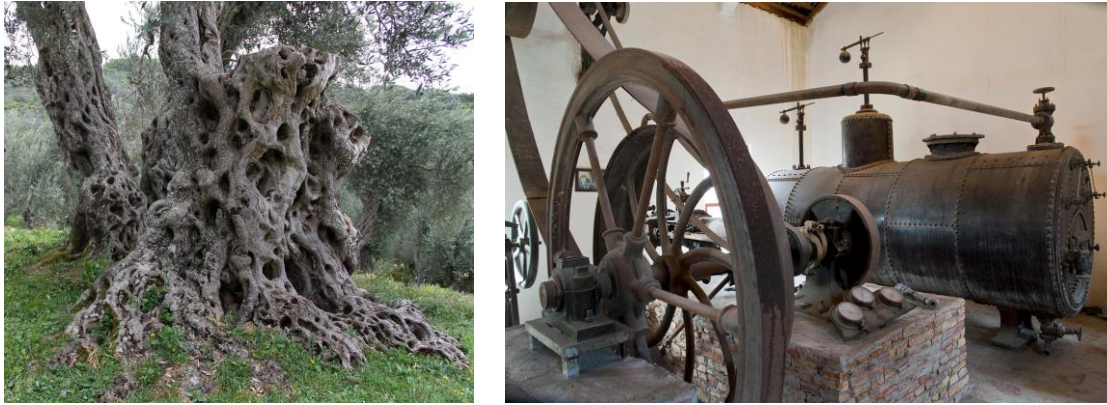
ağacı yer almaktadır (Resim 2.1.). Meyveleri, Akdeniz’e kıyısı olan ülkelerin ve ülkemizin vazgeçilmez besin kaynaklarından biri olan zeytin (*Olea europaea* L) bitkisi (Oleaceae) genellikle meyve yağı, salamura olarak meyveleri, zeytin altı suyu ve yapraklarından yararlanılan bir bitkidir (Fistonc ve diğerleri, 2012; Barbaro ve diğerleri, 2014; Hande Gursöy-Haksevenler ve diğerleri, 2014).



Resim 2.1. Atina'da basılan Tetradrachma bir zeytin ağacı ile dekore Attika kask ile Athena, zeytin dalı ve baykuş (<http://www.sabor-artesano.com/gb/olive-tremythology.htm>).

Özellikle Anadolu ve Antik yunan medeniyetlerinde kutsal kabul edilen yaşlı zeytin ağaçları ve teknoloji devrimiyle gelişen zeytin yağı üretim yöntemleri dikkati çekmektedir (Resim 2.2.).

Zeytin yaprağında polifenolik bileşiklerin oranı yüksektir (Castro ve Japon-Lujan, 2006). Oleuropein, yapraktaki asıl fenolik bileşik olmakla birlikte, yaprakta fenolik glikozidler, esterler, diğer sekoiridoidler, flavonoidler (rutin, quercetin, luteolin vb), hidroksitirozol'den türeven bileşikler, verbaskozid gibi hidrosinamik asid türevleri bulunmaktadır (Ryan ve diğerleri, 2003; Baycin, ve diğerleri, 2007; Kontogianni ve Gerothanassis, 2012). Zeytin yaprağında bulunan ve etkileri bakımından literatür verisi bulunan başlıca fenolik bileşikler Şekil 2.14.'de yer almaktadır.

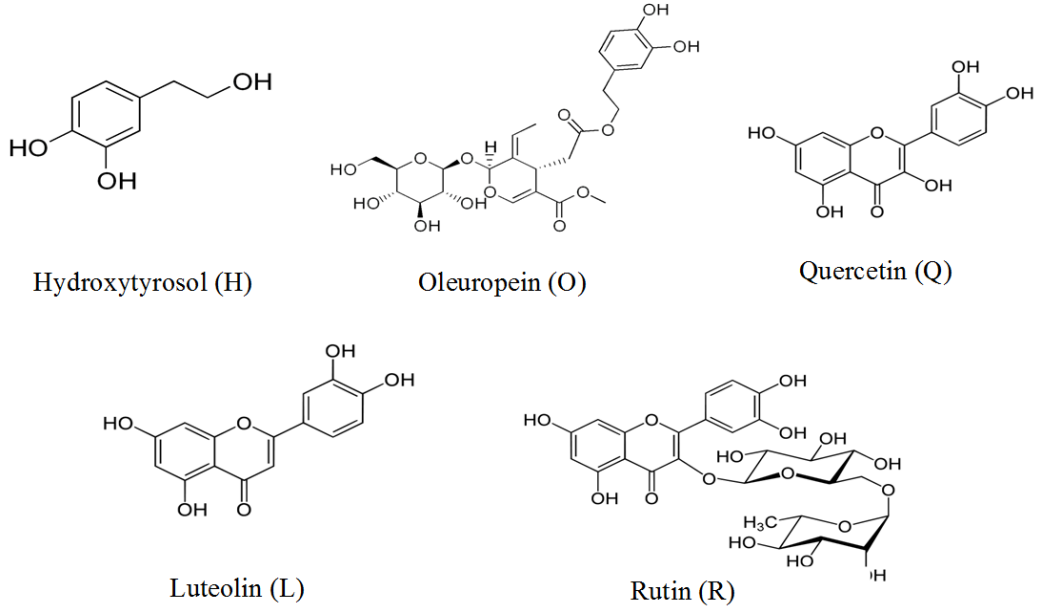


Resim 2.2. Antik Zeytin ağacı ve zeytin işleme ünitesi (EDREMIT OLIVE OIL MUSEUM

Mill: Sabit Ertur Gıda ve Yağ Sanayi ve Ticaret Ltd. Sti. Eski Bayramyeri No:25

Edremit Olive Oil Museum: Kurucay Mevkii Edremit)

Bitkisel kaynaklı doğal ajanlar olarak zeytin yaprağı polifenolik bileşikler, hücreyi redoks hasara karşı koruyucu ve onarıcı özelliklerinden dolayı, son yıllarda, hem deneysel hem de klinik araştırmaların ilgi odağındadır (de Bock ve diğerleri, 2013; , Lerman ve Lerman, 2013; Barbaro ve diğerleri, 2014). Zeytin yaprağı fenolikleri güçlü antioksidandır (Paiva-Martins ve Gordon, 2001). Çok yeni bir çalışmada, zeytin yaprağı ekstresinde bulunan oleuropein ve tyrosol'ün linoleik asit peroksidasyonunu en yüksek düzeyde önlediği gösterilmiştir. Yaprak deoksijenasyonunda bulunan “taxifolin” ve “fraxamoside”, ksantin oksidazın en güçlü inhibitörü olarak gösterilmiştir (Marino ve diğerleri, 2014). Zeytin yaprağı polifenoliklerinin bağışıklık sistemini güçlendirdiği, anti-viral, anti-bakteriyel, anti-kanserojen ve anti-fungal etkili olduğu ispat edilmiştir (Amin ve diğerleri, 2013; Tezcan ve diğerleri, 2014). Zeytin yaprağı polifenolik bileşikler anti-proliferatif etkilidir (Fares ve diğerleri, 2011); kemoterapi gören kanser hastalarında inflamatuvar sitokin düzeylerini azaltır (Ahmed, 2013; Marino ve diğerleri, 2014); periferik lökositleri adrenalinin indüklediği DNA hasarına karşı korur (Cabdiğerleriapa ve diğerleri, 2014); serebral iskemi reperfüzyona karşı korur (Dekanski ve diğerleri, 2011); insan kanser hücrelerinde, hücre siklusunu progresyonunu modüle eder (Bouallagui ve diğerleri, 2011).

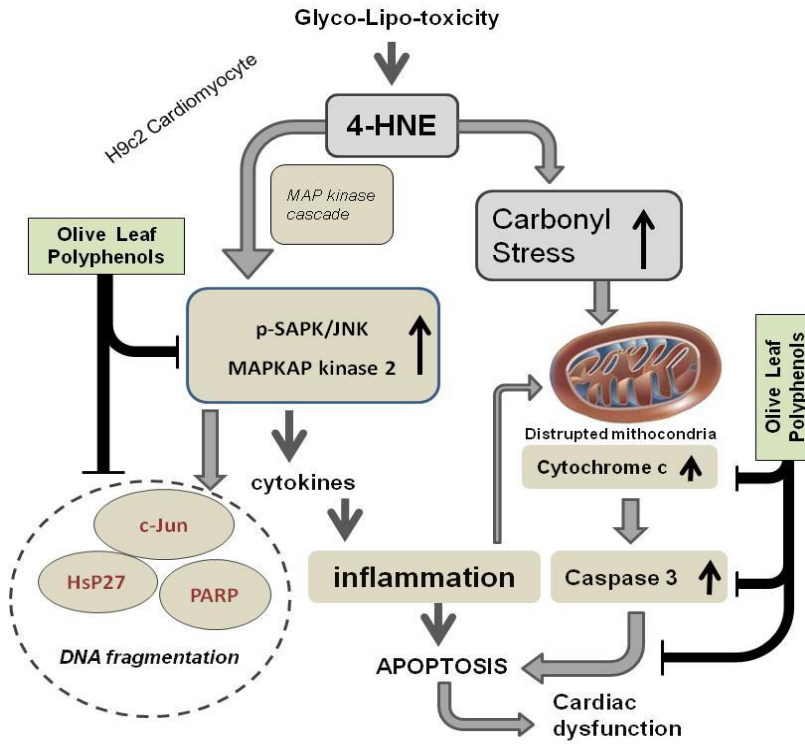


Şekil 2.14. Zeytin yaprağında bulunan başlıca fenolik bileşikler.

Zeytin yaprağı polifenolik bileşikleri, anti-hiperglisemik etkilidirler (Önderoğlu ve diğerleri, 1999); anti-hiperkolesterolemik etkileri vardır ve insülin direncini kırarlar (Bennani-Kabchi ve diğerleri, 1999) ve insülin duyarlılığını arttırırlar (de Bock ve diğerleri, 2013); hipolipidemik etkileri anti-oksidan etkilerine eşlik eder (Jemai ve diğerleri, 2008); anti-trombotiktirler (Dub ve Dugani, 2013); anti-atherosklerotik özellikleri vardır (Lerman ve Lerman, 2013); L-tipi kalsiyum kanal antagonisti etkiler gösterirler (Scheffler ve diğerleri, 2008); diyabetik deney hayvanlarında renal bozuklukları düzeltirler (Mapanga ve diğerleri, 2009); yüksek karbohidrat ve yağ diyeti ile beslenmiş sıçanlarda metabolik, kardiyak ve hepatik bozuklukları azaltırlar (Poudyal ve diğerleri, 2010); nöroprotektif etkileri farklı hayvan modellerinde gösterilmiştir (Mohagheghi ve diğerleri, 2011; Dekanski ve diğerleri, 2011); anti-hipertansif etkileri geniş çaptaki klinik çalışmalarda ortaya konmuştur (Wong ve diğerleri, 2014).

Laboratuvarımızda yapılan çalışmalar, zeytin yaprağı standardize ekstrelerinin ve buradan izole edilmiş fenolik yapıdaki bileşiklerin (oleuropein, hidroksitirozol, quercetin, luteolin, rutin, verbaskozid) pankreas beta-hücrelerini oksidan strese ve inflamatuvar süreçleri tetikleyen uyarılara karşı, metabolik parametreler, sinyal molekülleri ve apoptotik süreçlerin kontrolü düzeylerinde koruduğunu (Cumaoglu ve diğerleri, 2011 (a), (b), kardiyomiyositlerde

karbonil stresin (4-HNE) oluşturduğu hasar biçimlerini önlediğini (Bali ve diğerleri, 2014) kanıtlamıştır. Söz konusu çalışmaların sonuçları Şekil 2.15. ve Şekil 2.16.'da yer almaktadır.



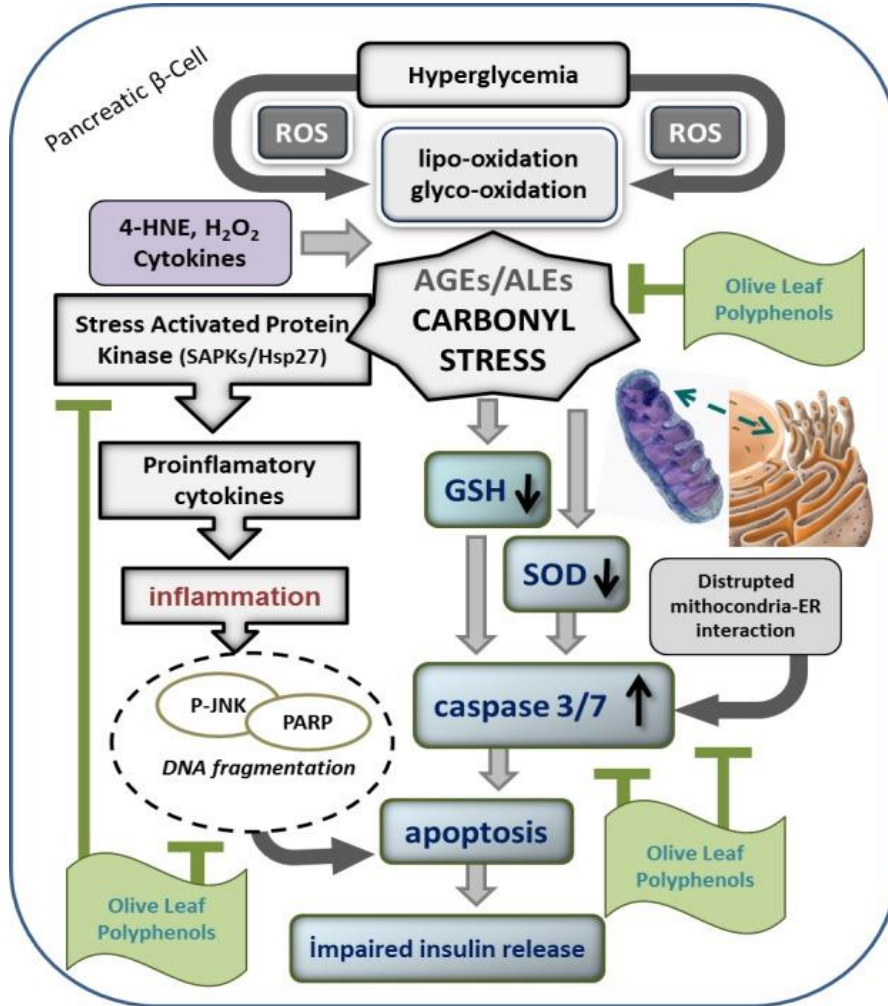
Şekil 2.15. Pankreas β -hücrelerine (INS1-E) zeytin yaprağından izole edilen polifenolik bileşiklerin antiapoptotik ve insülin salıverilmesi üzerindeki düzenleyici etkilerinin mekanizması (Ergin ve diğerleri, 2013).

2.7.Ksanti n(X)/Ksantin Oksidaz (XO)

Hipoksantin ve ksantin, mutagen etkisiyle meydana gelen pek çok nükleobazdan ikidisi, her ikisi de deaminasyon (bir amin grubunun hidroksil grubu ile değişmesi) ürünleridir. Hipoksantin adeninden, ksantin ise guaninden meydana gelir. Benzer şekilde, sitozinin deaminasyonundan ise urasil oluşur (Nguyen ve diğerleri, 1992) (Şekil 2.18).

Ksantin oksidaz (XO), pürin degradasyonunda son basamakta etkili, oksidoredüktazlar grubundan bir enzimdir. Ko-faktörü molibden olan bir metaloflavoproteindir. Pürin degradasyonu söz konusu olduğu için ürik asit üretiminde rol oynayan enzim olarak bilinir.

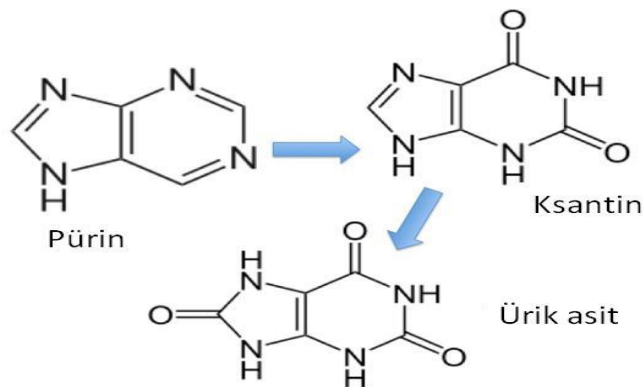
Daha çok karaciğer böbrek ve ince barsakta bulunur. Ksantin oksidaz, ksantin ile reaksiyona girerek superoksit ($O_2^{\bullet-}$) oluşturur. Superoksit ise superoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüştürülür (Şekil 2.16.).



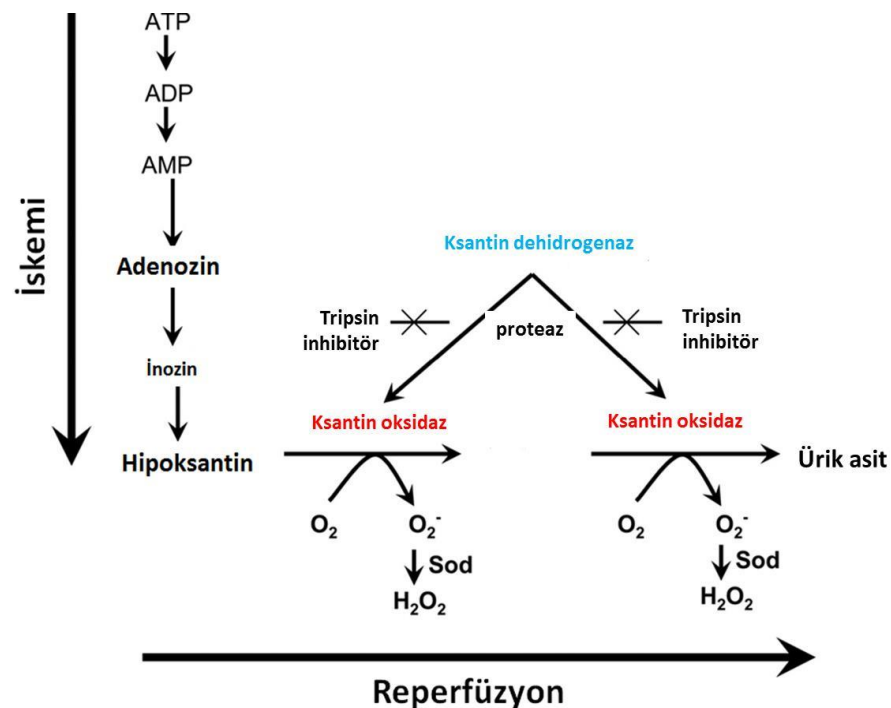
Şekil 2.16. Kardiyomiyositlerde (H9c2) zeytin yaprağından izole edilen polifenolik bileşiklerin karbonil strese karşı antiapoptotik ve protektif etkilerinin mekanizması (Bali ve diğerleri, 2014).

Serbest radikal (superoksit) oluşturan bir enzim olarak ksantin oksidaz, egzersiz fizyolojisi, diyabet, sarkopeni, kardiyak iskemi/reperfüzyon hasarı gibi durumların hücrel mekanizmalarında önemli bir komponentdir (Şekil 2.17).

Bu bağlamda ksantin oksidaz inhibitörü, eski ve ucuz ilaç “allopurinol”, son yıllarda reaktif radikallere bağlı oksidatif doku hasarının önlenmesinde yeniden gündeme gelmiştir (Sanchis-Gomar ve diğerleri, 2014; Ferrando ve diğerleri, 2014; Sanchis-Gomar ve diğerleri, 2014). “Febuxostat” ise yeni bir ksantin oksidaz inhibitörü olarak klinik faz deneylerindedir (Stamp ve Chapman, 2014).



Şekil 2.17. Ksantin



Şekil 2.18. Kardiyak iskemi/reperfüzyon hasarında, ksantin oksidaz/ksantin ile tetiklenen oksidatif stres.

3. YÖNTEM

3.1. Laboratuvar

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim dalı “Cellular Stress & Signal Transduction Research Laboratory” olanakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01-2012-53 sayı numarasıyla desteklenmiştir.

3.2. Hücre Kültürü: H9c2 (Rat Kardiyomiyoblast)

Çalışmalarımızda ticari olarak elde edilmiş, sıçan kardiyomiyoblast hücre hattı kullanılmıştır [American Tissue Type Collection, ATCC® CRL-1446, (#CRL-1446; Rockville, MD, USA)]. Hücreler 37 °C sıcaklıkta, % 5 karbondioksit içeren steril inkübatörde kültürlenmiştir. Kültür kaplarına (75 cm²) ekilen hücreler, %10 FBS + 2mM L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM içerisinde çoğaltılmışlardır. Hücre kültürü için takib eden standart işlemler gerçekleştirilmiştir: 1 ml kültür ortamı içeren kültür kaplarına 5x10⁴ yoğunlukta ekilen hücreler, kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkanıp tripsinize edilmişlerdir. İşlemler sonrasında Trypsin/EDTA yardımıyla kültür kabı tabanından hücreler kopararak pasajlanmışlar. Deneyler pasaj numarası 54-60 arası hücrelerde tamamlanmıştır. Kardiyak hücreler santrifüj sonrası toplanarak 50 mM buzlu potasyum fosfat tamponu içinde, pH 7,4'te ve 2 mM EDTA varlığında yeniden suspanse edilmişlerdir. Sonikatörden geçirilen hücreler, 13,000×g'de 10 dk ve 4 °C'de santrifüj edilmişlerdir. Süpernatant ileri deneyler için kullanılmıştır (Cao ve Li, 2004; Bali ve diğerleri, 2014).

3.3. Oksidatif Stresin Ksantin/Ksantin Oksidaz İle İndüklenmesi

Ksantin + ksantin oksidaz (X/XO) kullanarak oksidatif sitotoksitenin indüklenmesi için 0.5 mM ksantin varlığında 0,01 – 50 mU/mL konsantrasyonda ksantin oksidaz hücrelere uygulanmış ve inhibisyon için ED50 değerini verecek konsantrasyon saptanmıştır. Bu konsantrasyon, MTT deneyleri sonucunda elde edilen grafik baz alınarak bulunmuştur. Hücreler ekstre veya fenolik bileşikler ile ön inkübasyondan (24 saat) sonra, 12 h X/XO (0,5 mM X / 5 mU/mL XO) ile muamele edilmişlerdir (Du ve diğerleri, 2007).

3.4. Standart Ekstre, Fenolik Bileşikler ve XO/X Uygulanması

Zeytin yaprağı ekstresi stok solüsyonu %10 DMSO içerisinde hazırlanmıştır. Dilüsyonlarında maksimum DMSO konsantrasyonu % 0,02'dir. Diğer polifenolik bileşikler kültür ortamında çözülmüşlerdir. Ekstre ve polifenolik bileşiklerin her biri 0,1, 10, 25, 50 µg/mL konsantrasyonlarda hücrelere 24 saat uygulandıktan sonra hücreler 12 saat X/XO (0,5 mM X/5 mU/mL XO) ile muamele edilmiştir (Du ve diğerleri, 2007).

3.5. Etkileri Test Edilen Redoks Düzenleyiciler:

3.5.1. “Oleuropein”, ticari olarak temin edilmiştir.

3.5.2. “Hydroxytyrosol”, ticari olarak temin edilmiştir.

3.5.3. “Quercetin”, ticari olarak temin edilmiştir.

3.5.4. Zeytin yaprağı ekstraktları.

İki farklı standardize zeytin yaprağı ekstresi kullanılmıştır Zeytin yaprağı (Resim 3.1.) standardize ekstresi ZEYEX® (Ext-1) adı altında, ve Ext-2 olarak, FARMASENS Firması, Gazi Üniversitesi, Teknoparkı, Gölbaşı, Ankara adresinden temin edilmiştir. Olea europaea L. var. Europaea Zhukovsky (AEF 23334) herbaryum örneği firmadan, ZEYEX'in üretim proses patentli olarak koruma altında olduğu ve oleuropein'e göre standardize edildiği ($\geq$ %20 oleuropein) bilgisi alınmıştır.



Resim 3.1.Zeytin yaprağı

3.6. Ölçümlenen Parametreler

3.6.1. Zeytin yaprağı ekstrelerinde total fenol miktarı

Ext-1 ve Ext-2 içerisindeki total fenolik bileşik miktarı spektrofotometrik olarak Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Singleton & Rossi, 1965). Ekstrelerden 0,1 ml alınmış 50 ml'lik balon jojeye konulmuş üzerlerine 5 ml saf su, 0,5 ml Folin-Ciocalteu (Merck KGaA, Germany) çözeltisi ilave edilmiş ve 3 dk bekledikten sonra 1 ml sodyum karbonat çözeltisi (%35, w/v) ilave edilerek, karışımlar saf su ile 50 ml çizgiye kadar tamamlanmıştır. Çözeltiler 2 saat karanlık ortamda bekletildikten sonra absorbanslar 760 nm de UV-Vis Spektrofotometre kullanılarak okunmuştur (Shimadzu, Japan). Kalibrasyon eğrisi gallik asid standardı kullanılarak oluşturulmuş ve konsantrasyonlar bu eğriye göre hesaplanmıştır. Total fenol miktarı, mg gallik asit eşdeğeri/gram kuru ağırlığın yüzdesi olarak verilmiştir. Elde edilen eğriden hesaplanan regresyon kat sayısı 0,9986'dır.

3.6.2. MTT (canlılık-sağkalım-viability)

Hücrelerde X/XO, fenolik ekstratlar ve fenolik standart bileşiklerin canlılığa olan etkileri MTT deneyi ile kolorimetrik yöntemle belirlenmiştir. Bu yöntem, ortama eklenen 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT) bileşiğinin indirgenmesi esasına dayanmaktadır. H9c2 hücreleri, başlangıçta hücre yoğunluğu $1-2 \cdot 10^4$ /kuyucuk olacak şekilde 96'lık hücre kültür plaklarına 200 µL "Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)" besi ortamı içerecek şekilde ekilmişlerdir. Hücreler, oksidatif stresi ve bununla ilişkili olarak apoptozu indüklemek için X/XO ile 37 °C'de muamele edilmişlerdir. Canlılığı optimum düzeyde inhibe eden (ED_{50}) X/XO konsantrasyonları MTT deneyi ile belirlenmiştir. Bunun yanı sıra ekstre ve fenolik bileşiklerin hücre canlılığı üzerine etkileri çeşitli konsantrasyonlar (0,1-100 µg/ml) kullanılarak, ayrı ayrı, MTT deneyi ile belirlenmiştir. Deneyler sonunda optimum etkili konsantrasyonlar belirlenmiş ve X/XO varlığında bu konsantrasyonlar (koruyucu) etkileri bakımından test edilmişlerdir. İnkübasyonlar bittikten sonra MTT, 50 µl (2 mg/ml PBS içinde) ortama konmuş ve 2 saat 37 °C'de inkübe edilmişlerdir. Sonra kültür ortamı (media) uzaklaştırılarak hücreler PBS ile durulanmışlardır. Bu işlemi takiben, her bir kuyucuk 60 µl DMSO, 240 µl of isopropanol ve 300 µl of deionize su varlığında, oluşmuş olan "formazan" kristallerinin çözülmesi için oda sıcaklığında muamele edilmişlerdir. Çözülmüş formazan daha sonra mikro küvetlere transfer edilerek absorbans, mikropilaka okuyucu spektrofotometrede 570 nm'de okutulmuştur (Janjic ve Wollheim, 1992; Bali ve diğerleri, 2014).

3.6.3. DCFH-DA deneyi (Reaktif Oksijen Türevleri (ROS)nin oluşumu)

Kardiyomiyositlerde reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumu-mevcudiyeti, Giardina ve Inan'ın tanımladığı metod esas alınarak ölçülmüştür (Giardina ve Inan, 1998). Hücreler, 96lık kültür plaklarına ekildikten sonra, ekstratlerden birinin veya fenolik bileşiklerden birinin varlığında ya da yokluğunda (kontrol hücreler şeklinde) inkübasyonu takiben Krebs Ringer Bikarbonat tampon çözeltisi (KRB) içersinde hazırlanmış 20 µM DCFH-DA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) solüsyonu ile 60 dakika 37 °C inkübasyona bırakılacaklardır. Hücre membranından kolaylıkla geçebilen DCFH-DA, hücre içi esterazlar tarafından floresan özelliği olmayan DCFHe dönüştürülmektedir. DCFH, hücre içi serbest radikaller tarafından

okside edildikleri zaman floresan ışık yayan DCFe dönüşmektedir (Swift & Sarvazyan, 2000). DCFH-DA eklendikten sonra KRB ile yıkanan hücreler yine KRB içerisinde hazırlanarak bu sefer ortama apoptoz indükleyici X/XO ilave edilmiştir. DCFin flourosan ışıması mikro-plak okuyucu flourometrede eksitasyon 485 nm de emisyon 528 nm de mikropkaka okuyucu kullanılarak (PowerWave XS2; BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Ölçülmüştür.

3.6.4. Western Blotlama yöntemi ile transkripsiyon faktörlerinin kantitasyonu

Fosfo MAPKAPkinaz-2 (p-MAPKAPkinaz-2)

Fosfo 44 (p-44)

Fosfo 42 (p-42)

Fosfo c-jun (p-c-Jun)

cl-kaspaz-3

Fosfo Hsp27 (p-Hsp27)

H9c2 hücreleri, 2.000.000 hücre olacak biçimde 25 cm² hücre kültür kabına (Sarstedt, Nürnberg, Germany) 5 ml RPMI-1640 besiyeri içerisinde ekildi. Hücrelerin kültür kabı tabanına tutunmaları için 24 saat karbondioksitli steril etüvde inkübe edildi. 24 saat sonunda kültür kaplarındaki besi yeri atıldı ve 0, 1, 25, 50 µmol/L konsantrasyonlarda X/XO içeren besiyeri eklendi. X/XO ve fenol kırmızısı içermeyen RPMI-1640 ile hücreler 1 saat inkübe edildiler. 1 saat sonunda besi yeri atıldı ve protein izolasyonu için kültür kabına 250 µL hücre lizis solüsyonu eklendi [(1% Triton, 20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 2.5 mM sodyum pirofosfat, 1 mM beta-gliserofosfat, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml leupeptin) + 1 mM PMSF (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)]. Lizis tamponu ile hücreler kazıyıcı yardımı ile toplandı. 5 dakika buz üzerinde bekletilen hücreler 20 saniye sonike edildikten sonra 10000 rpm +4 °C de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatanda BCA (Bisinkoninik asit, Pierce Rockford, IL, USA) protein tayin kiti kullanılarak protein miktarı ölçüldü. Protein örnekleri yükleme tamponu içerisinde 5 dakika kaynatıldıktan sonra kuyucuklarda 35 µg protein olacak şekilde % 5 paketleyici, % 12 ayırıcı sodyum dedosil sülfat içeren poliakrilamid jele yüklenerek 200 volt da yaklaşık 60-75 dk elektroforez edildi. Elektroforez ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler 90 dakika 200 mAmp sabit akıma tabi tutulup % 20 metanol içeren transfer tampon içerisinde PVDF (0.22 µm Poliviniliden florid) membrana transfer edildi. Membran bloklama solüsyonu ile

1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Süt tozu ile bloklama işlemi tamamlanan membran 3 kez 10 dakika TBST ile yıkandıktan sonra 10 ml primer antikor ile gece boyu +4 °C de inkübasyona bırakıldı. Primer antikorla immün işaretlenen membranlar 3 kez TBST ile yıkandıktan sonra 2 saat oda sıcaklığında 10 ml HRP (Horse radish peroksidaz) işaretli sekonder antikorla (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) inkübasyona bırakıldı. Sekonder işaretlemeden sonra membran 2 kez TBST 1 kez TBS ile yıkandıktan sonra 10 ml ECL (West-Femto ECL Kemiluminesans reaktif) (Pierce, Rockford, IL, USA).içersine atıldı ve membrandan gelen sinyaller mavi tabanlı X-ray filme yakılıp developer ve fiksatif çözeltilerinde banyo edilerek görünür hale getirildi. (Gel Logic 2200 Pro, Carestream Health, Rochester, NY, USA). Proteinlerin miktarı Carestream Molecular Image Software kullanılarak belirlendi.

Reaktifler

Hücre lizis solüsyonu: 50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.25% Na-deoksikolat

3X Yükleme tamponu: 2.4 ml 1M Tris-HCl, 3 ml % 20 SDS, 3 ml Gliserol, 1.6 ml β -merkaptotanol, 0.006 Bromofenol mavisi toplam hacim 10 ml.

%5 lik paketleyici jel: Distile su, % 30 Akrilamid/bisakrilamid karışımı (29/1), 1 M Tris HCl pH:6.8 , % 10 Sodyum dedosil sülfat (SDS), % 10 Amonyum persülfat (APS), TEMED (Tetrametiletildiamid)

Çizelge 3.1. Paketleyici Jel İçeriği

% 5 Paketleyici Jel	Toplam 4 ml	Toplam 5 ml	Toplam 6 ml
Distile su	2.7 ml	3.4 ml	4.1 ml
% 30 Akrilamid karışımı	0.67 ml	0.83 ml	1 ml
1.0 M Tris-HCl pH:6.8	0.5 ml	0.63 ml	0.75 ml
% 10 SDS	0.04 ml	0.05 ml	0.06 ml
% 10 APS	0.04 ml	0.05 ml	0.06 ml
TEMED	0.004 ml	0.005 ml	0.006 ml

%12 lik ayırıcı jel: Distile su, % 30 Akrilamid/bisakrilamid karışımı (29/1), 1.5 M Tris HCl pH:8.8, % 10 Sodyum dedosil sülfat, % 10 Amonyum persülfat, TEMED (Tetrametiletilendiamid)

Çizelge 3.2. Ayırıcı Jel İçeriği

% 12 Ayırıcı Jel	Toplam 10 ml	Toplam 15 ml	Toplam 20 ml
Distile su	3.3 ml	5 ml	6.6 ml
% 30 Akrilamid karışımı	4 ml	6 ml	8 ml
1.5 M Tris-HCl pH:8.8	2.5 ml	3.8 ml	5 ml
% 10 SDS	0.1 ml	0.15 ml	0.2 ml
% 10 APS	0.1 ml	0.15 ml	0.2 ml
TEMED	0.004 ml	0.006 ml	0.008 ml

Elektroforez yürütme tamponu: 30 gr Tris baz, 144 gr Glisin, 10 gr Sodyum dedosil sülfat tartılıp pH: 8.3 ayarlandıktan sonra 1 litreye distile su ile tamamlandı.

Transfer tamponu: Sodyum dedosil sülfat içermeyen, %20 metanol içeren elektroforez yürütme tamponu

TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl pH: 7.4

TBST: % 0.1 Tween 20 içeren TBS

Bloklama solüsyonu: % 3 yağsız süt tozu (Pierce) içeren TBST

Çizelge 3.3. Kullanılan primer ve sekonder antikorların dilüsyonları

Antikor	Dilüsyon	Sekonder antikor	Dilüsyon
p-c-jun	1:1000	Anti-Rabbit	1:1000
p-44	1:1000	Anti-Mause	1:1000
p-42	1:100	Anti-Rabbit	1:5000
p-Hsp27	1:100	Anti-Goat	1:5000
p-MAPKAPkinaz-2	1:200	Anti-Mause	1:1000
cl-kaspaz-3	1:100	Anti-Goat	1:5000

3.7. Deneylerde Kullanılan Reaktifler, Kimyasallar ve Sarf Malzemesi

Deneylerimizde kullandığımız kimyasallar ve solventler analitik kategoride olacak biçimde temin edilmişlerdir. Aşağıdaki listede kimyasal ve solventler temin edildikleri kaynaklar belirtilerek sıralanmışlardır.

Çizelge 3.4. Kimyasallar, solventler ve sarf malzemeler

Adı	Marka-Menşei
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	SIGMA ALDRICH (ST. LOUIS, USA)
PMSF	ROCHE DIAGNOSTICS, MANNHEIM, GERMANY
BCA	BISINKONINIK ASIT, PIERCE ROCKFORD, IL, USA
Fetal bovine serum (FBS)	HYCLONE-ABD
HRP (Horse radish peroksidaz)	BEVERLY, MA, USA
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)	SIGMA ALDRICH (ST. LOUIS, USA)
ECL (West-Femto ECL Kemiluminesans reaktif)	ROCKFORD, IL, USA
TBST	HZIRLAMA
TBS	HAZIRLAMA
2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)	SIGMA ALDRICH (ST. LOUIS, USA)
PBS	LONZA, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	SIGMA ALDRICH (ST. LOUIS, USA)
Tyripsin 0.25% (1x) solution	SIGMA ALDRICH (ST. LOUIS, USA)
EDTA	FISHER,USA
RPMI-1640, without L-Glutamine	LONZA, USA
RPMI-1640, w/o L-Glutamine/Phenol Red	LONZA, USA
Tissue Culture Flax T-75 cm	SARSTEDT, GERMANY
Tissue Culture Flax T-25 cm	SARSTEDT, GERMANY
Tissue Culture Plate 96-well	SARSTEDT, GERMANY
Centrifuge tube 15 ml	SARSTEDT, GERMANY
Zeytin yaprağı ekstresi	(ZeyEX®)
FARMASENS (Ext-2)	FARMASENS (ANKARA)

Çizelge 3.4.(devam) Kimyasallar, solventler ve sarf malzemeler

Adı	Marka-Menşei
Oleuropein (HPLC grade ≥ 96 %)	APPLICHEM A6909 LOT # 12101123
Hydroxytyrosol (HPLC grade ≥ 98 %)	APPLICHEM A5303 LOT # 11120406)
Folin-Ciocalteu	MERCK KGAA, GERMANY
KRB	SIGMA ALDRICH (ST. LOUIS, USA)
Quercetin	SIGMA ALDRICH (ST. LOUIS, USA)

3.8. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Çizelge 3.5. Cihazlar

Adı	Marka- Menşei
Mikroplaka okuyucu (Microplate reader)	(BİO-TEK ELX800, BİOTEK INSTRUMENTS), ABD
Inverted mikroskop	LEİCA,
Soğutmalı masa üstü santrifüj	HETTİCH ,TÜRKİYE
ELISA Turner Biosysytems	MODULUS
Derin dondurucu, -86°C	SANYO, JAPAN
CO2 inkübatör	SANYO, JAPAN
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell”	BİO-RAD, ABD
Kuru Blok ısıtıcı Termostat,	BİO-RAD, ABD
Dikey Elektroforez Sistemi	BİO-RAD, ABD
BioShaker	SANYO, JAPAN
Spektrofotometre	SHİMADZU, JAPAN

3.9. İstatistiksel Analizler

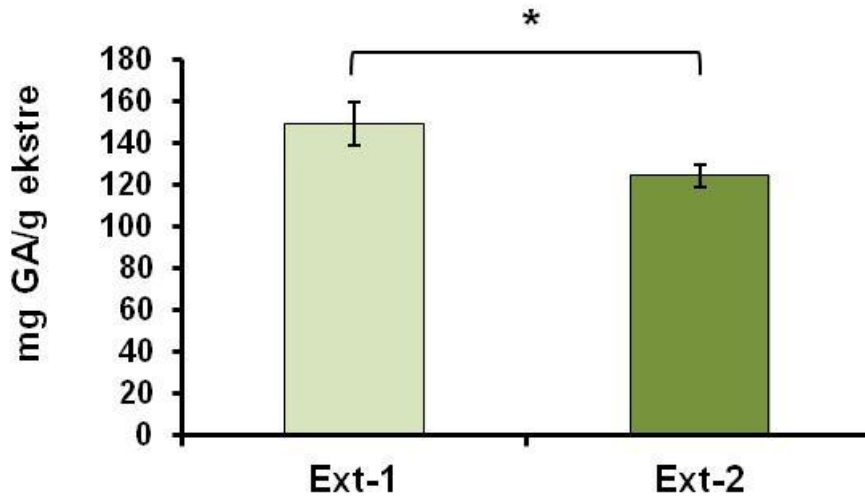
Verilerin bilgisayar ortamına girilmesinde Microsoft Office Excel 2007 ® (Microsoft Corporation,USA) programı, verilerin tanımlayıcı analizi ve yorumlanmasında Windows için Statistical Package for the Social Sciences ® (SPSS Inc.,Chicago,Ilinois,USA) 19.0 istatistik paket programı kullanıldı.

Ortalamalar arasındaki farkın önem kontrolü, ANOVA testi ile yapıldı. Bu testte anlamlı çıkan gruplar için posthoc Tukey testi uygulandı. $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ve tüm veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

4.1. Ekstrelerin total fenol içeriği

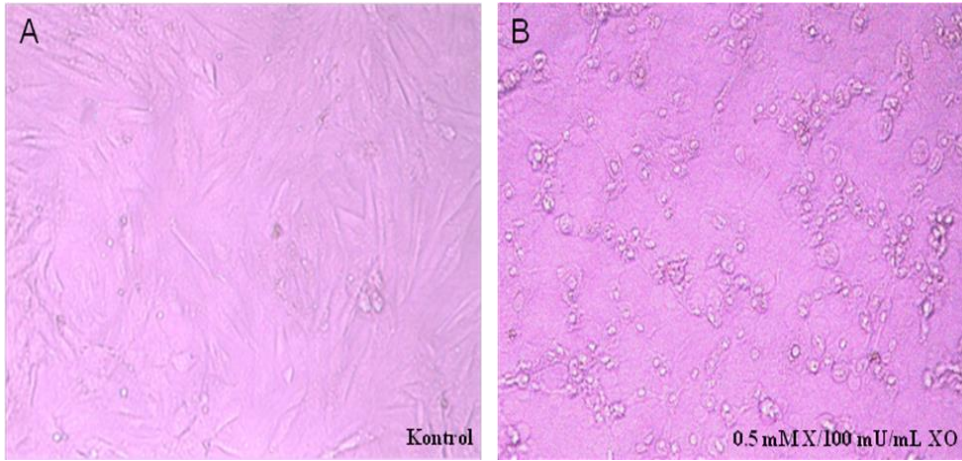
Total fenol miktarı, Ext-1 için 149 ± 10.15 ; Ext-2 için 124 ± 5.28 (mg GA/g ekstre) olarak bulunmuştur (Çizelge 3.4). Bu miktarlar literatürde farklı ülke ve bölgelerden elde edilen zeytin yapraklarından farklı solvanlar-yöntemler kullanılarak elde edilen ekstrelerin total fenol içerikleri ile uyumludur (Kontogianni ve Gerothanassis, 2012; Lafka ve diğerleri, 2013).



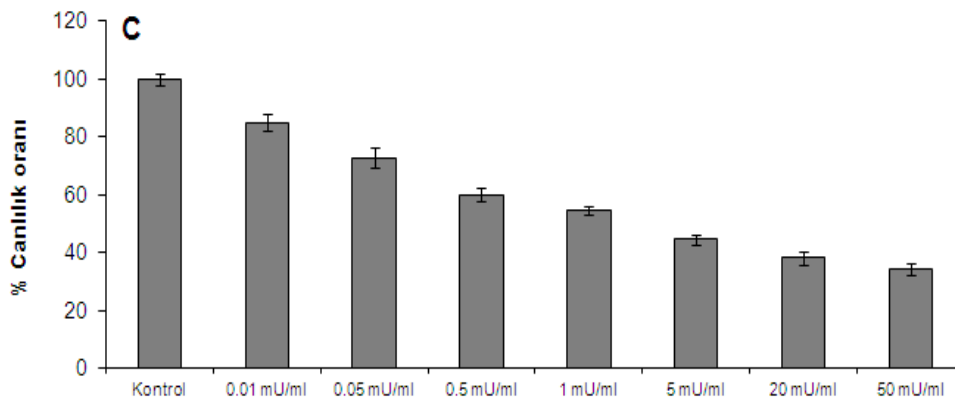
Şekil 4.1. Ext-1 (etanolik, ZEYEX®) ve Ext-2 (metanolik) ekstrelerinde saptanan total fenolik bileşik miktarı. (ANOVA) * $p < 0.05$, iki grup arasında istatistiksel fark

4.2. H9c2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerine X/XO İnkübasyonunun Etkileri

H9c2 hücreleri 0.5 mM ksantin varlığında 0.01 – 50 mU/ml konsantrasyonda ksantin oksidaz ile inkübe edildiklerinde canlı hücre sayısı konsantrasyona bağlı olarak azalmıştır. Sonraki deneylerde $O_2^{\bullet-}$ aracılı oksidatif stresi indüklemek için 0.5 mM/50 mU/ml kabul edilmiştir (ED₅₀)



Resim 4.1. Hücre canlılığı üzerine X/XO etkisinin mikroskopik görüntü

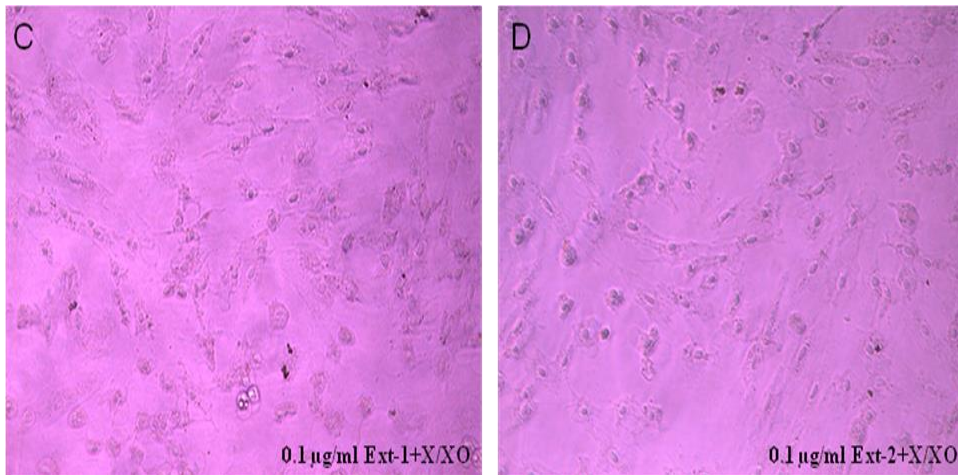


Şekil 4.2. X/XO inkübasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi.

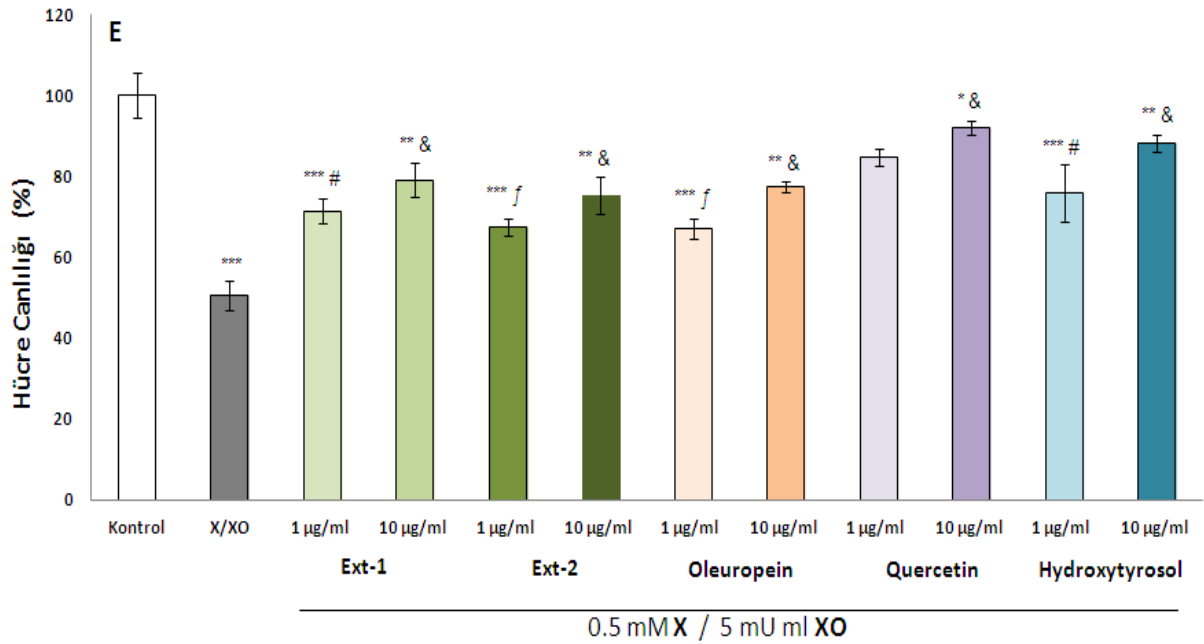
X/XO inkübasyonunun H9c2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi. (Resim 4.1.) (A) Hücre kültür ortamında fotomikrografik görüntü. Normal besi yerinde, standart koşullarda 24 saat inkübe edilmiş hücreler; (B) 0.5 mM X / 5 mU/m XO ile 12 saat inkübe edilmiş hücreler, X100. (Şekil 4. 2.)(C) 0.5 mM X (ksantin) varlığında farklı konsantrasyonlarda (0.01 – 50 mU/mL) ksantin oksidaz (XO) ile 12 saat inkübe edilmiş hücrelerde canlılığın konsantrasyona bağlı olarak azalması (MTT test).

4.3. Ekstreler ve Polifenolik Bileşiklerin X/XO Varlığında H9c2 Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkileri

Gerek ekstreler (Ext-1, Ext-2) gerekse polifenolik bileşikler (oleuropein, quercetin, hidroksitirozol), 0.1-10 µg/ml dozlarda, X/XO'ın hücre canlılığını inhibe edici etkisini anlamlı olarak önlemişlerdir ($p < 0.05$ - $p < 0.001$)



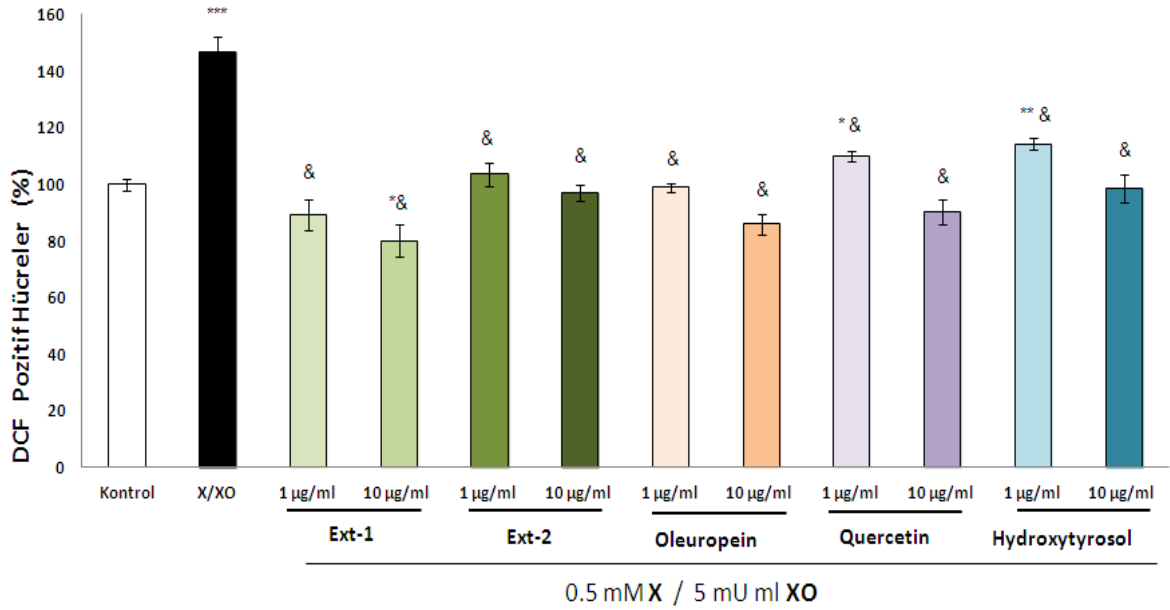
Resim 4.2. (C) 0.1 µg/ml Ext-1, (D) 0.1 µg/mL Ext-2 ile 24 saat ön inkübasyonu takiben X/XO'ın 12 saat inkübasyonu sonrasında hücre kültür ortamından alınan fotomikrografik görüntü.



Şekil 4.3. (E) X/XO (0.5 mM/5 mU ml)'ın hücre canlılığını inhibe edici etkisi üzerinde, ekstreler ve polifenolik bileşiklerin önleyici etkileri. 24 saat ön inkübasyonu takiben X/XO ile 12 saat inkübasyon sonrasında yapılan MTT test. (ANOVA) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Kontrole göre istatistiksel fark ; ^f $p < 0.05$, [#] $p < 0.01$, [&] $p < 0.001$ X/XO oranla istatistiksel fark

4.4. H9c2 Hücrelerinde Ros Üretimi, Ekstreler ve Polifenolik Bileşiklerin X/XO Varlığında Ros Düzeylerine Etkileri

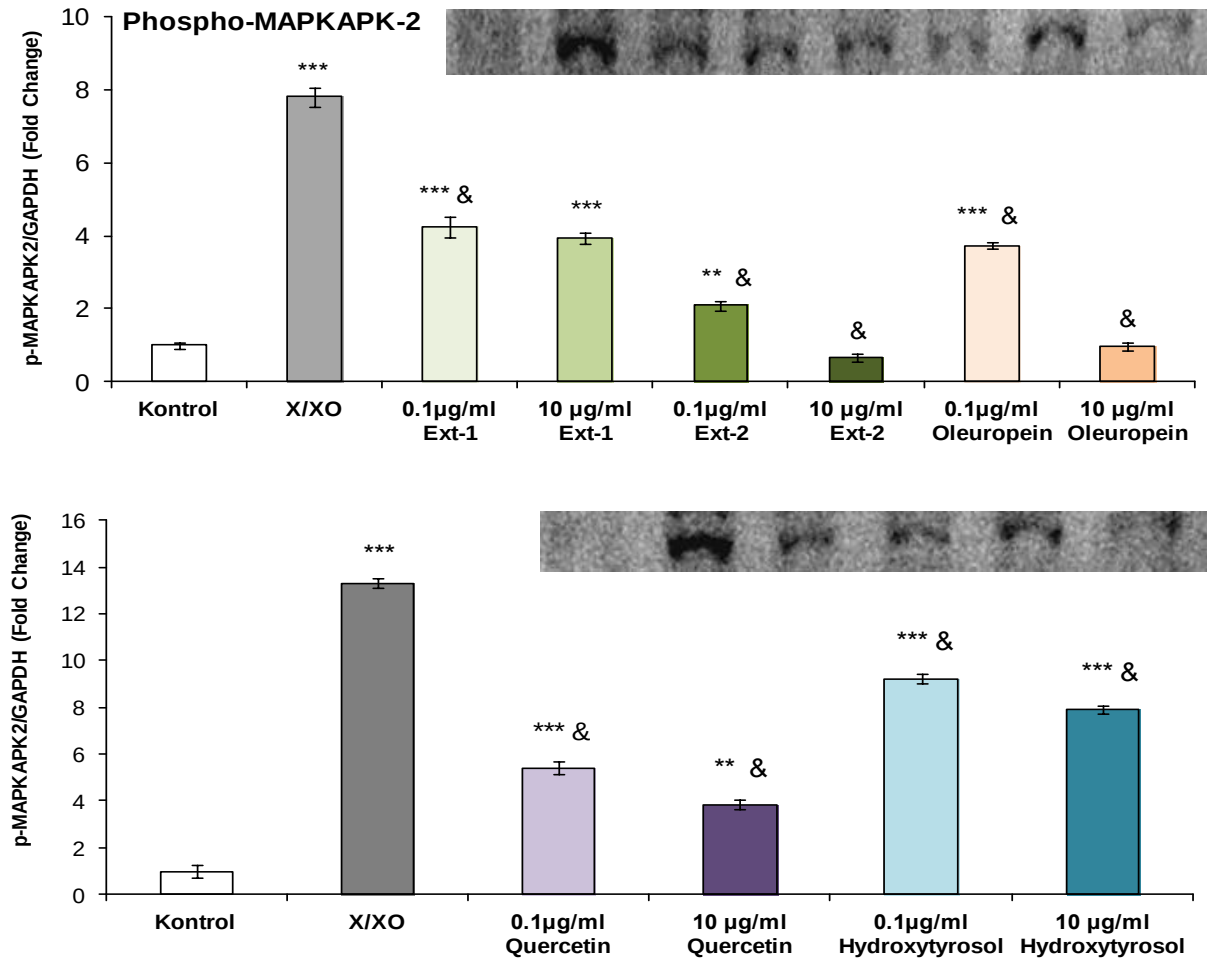
X/XO ile muamele edilen H9c2 hücrelerinde ROS üretimi anlamlı olarak artmıştır (~% 150). Ext-1 ve Ext-2 (1 µg/ml - 10 µg/ml) X/XO ile indüklenen bu artışı tamamen önlemiştir. Ext-1, 10 µg/mL konsantrasyonda kullanıldığında ROS düzeylerini kontrollerden elde edilen ortalamaların da altına çekmiştir. Oleuropein (1-10 µg/ml), quercetin (10 µg/ml) ve hidroksitirozol (10 µg/ml), X/XO aracılı ROS üretimini tamamiyle önlemeyi başarmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. X/XO'ın hücre içi ROS üretimine etkisi ve ekstrakter ve polifenolik bileşikler ile ön inkübasyonun X/XO ile indüklenmiş ROS düzeylerine etkileri. Ekstreler veya polifenolik bileşiklerin her biri ile iki farklı konsantrasyonda (1 µg/ml - 10 µg/ml) 24 saat ön inkübasyonu takiben X/XO ile (0.5 mM/5 mU ml) ile 12 saat inkübasyon sonrasında yapılan DCFDA deneyinin sonuçları. (ANOVA) **p<0.01, ***p<0.001 Kontrole göre istatistiksel fark ; ^fp<0.05, [#]p<0.01, [&]p<0.001 X/XO oranla istatistiksel fark (DCFH-DA deneyi). (ANOVA) **p<0.01, ***p<0.001 Kontrole göre istatistiksel fark ; [&]p<0.001 X/XO oranla istatistiksel fark

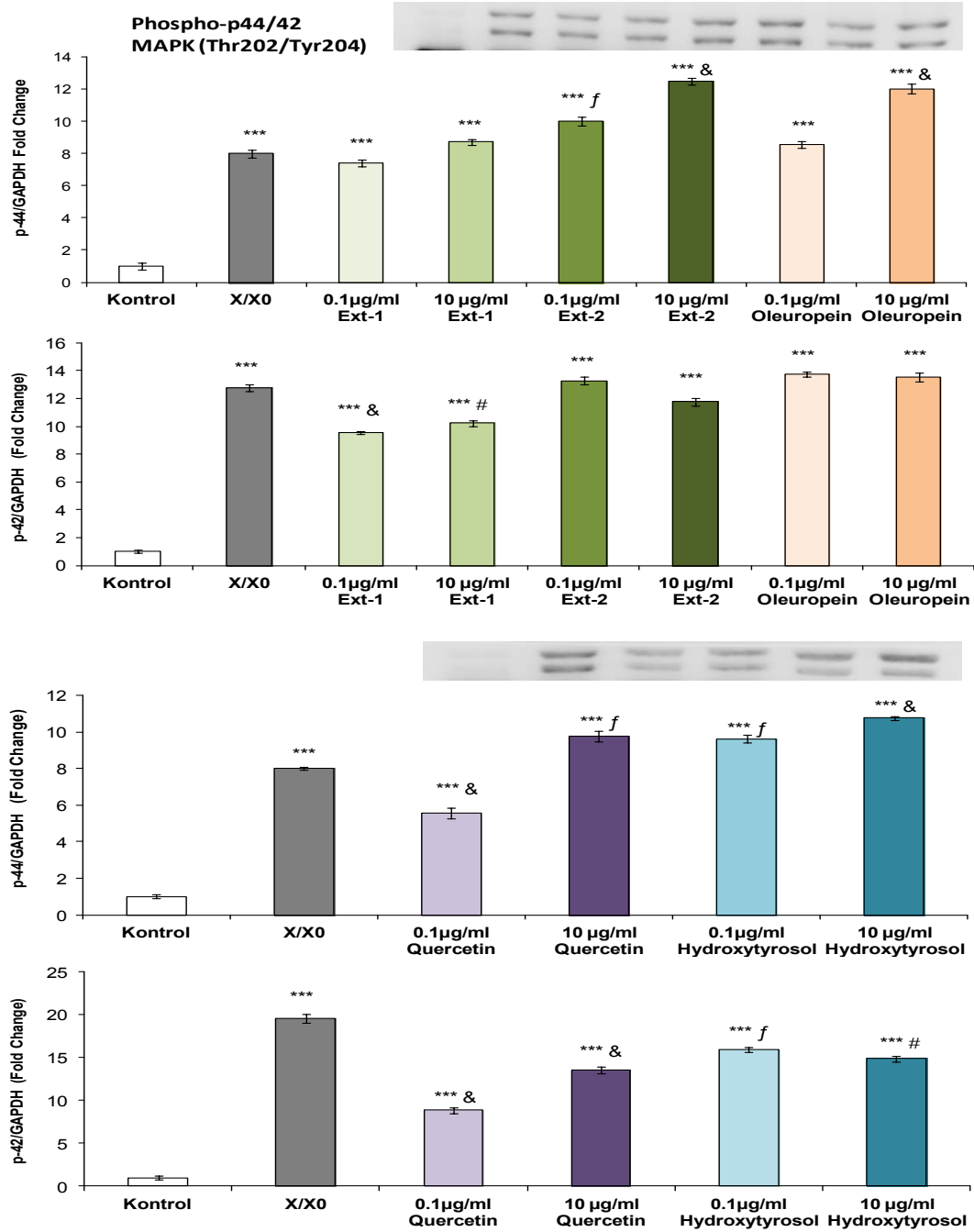
4.5. H9c2 Hücrelerinde P-Mapkapk-2 Protein Düzeyleri: X/Xo, Ekstreler ve Polifenolik Bileşiklerin Etkileri

X/XO (0.5 mM/5 mU ml) ile 12 saat inkübasyon sonrasında p-MAPKAPK-2 indüklenmiştir (~ %100).



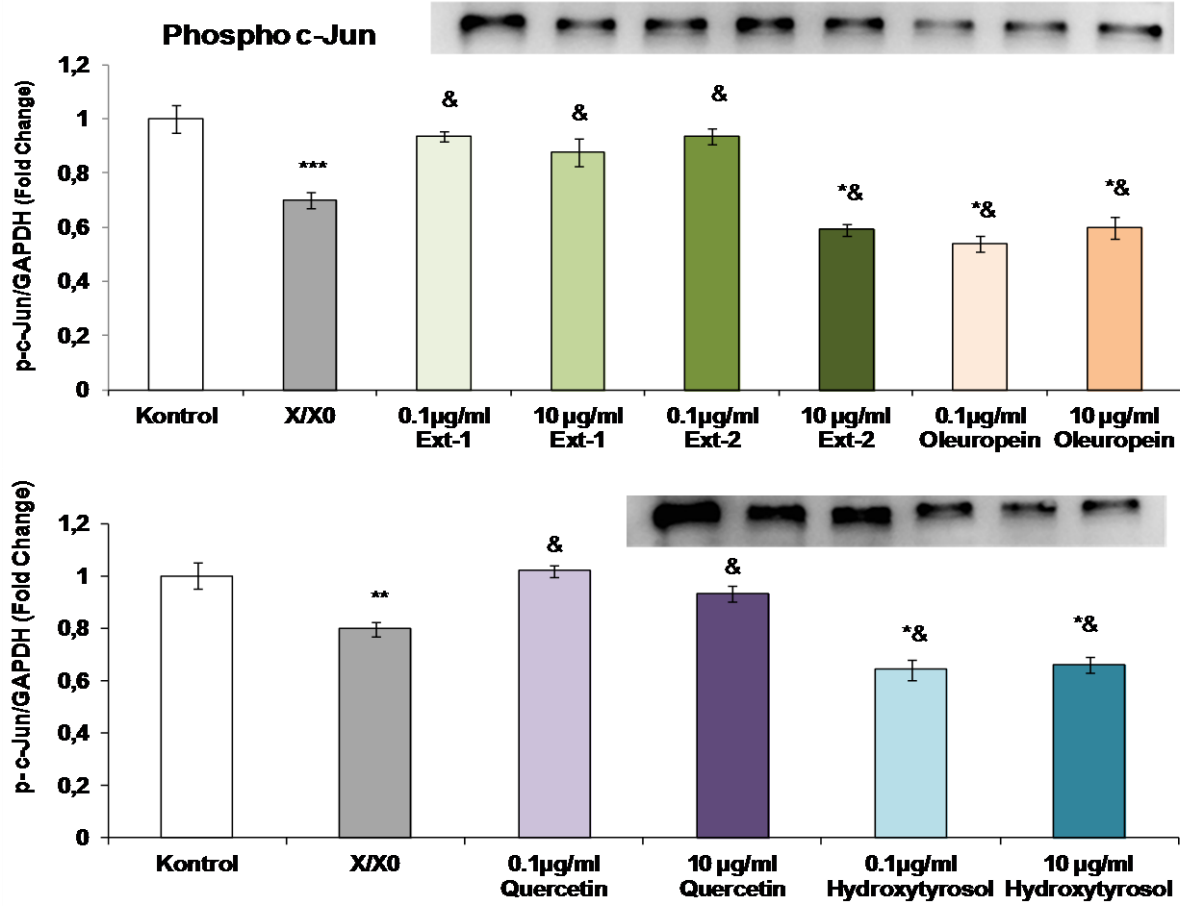
Şekil 4.5. X/XO'ın tek başına inkübasyonu sonrasında ve ekstreler ve polifenolik bileşiklerin her biri ile ön inkübasyonu takiben X/XO inkübasyonu sonrasında p-MAPKAPK-2 protein düzeyleri. (ANOVA) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Kontrolle göre istatistiksel fark; $^f p < 0.05$, $^{\#} p < 0.01$, $^{\&} p < 0.001$ X/XO oranla istatistiksel fark

4.6. H9c2 Hücrelerinde Fosfo P44/P42-Mapk (Erk) Protein Düzeyleri: X/Xo, Ekstreler ve Polifenolik Bileşiklerin Etkileri



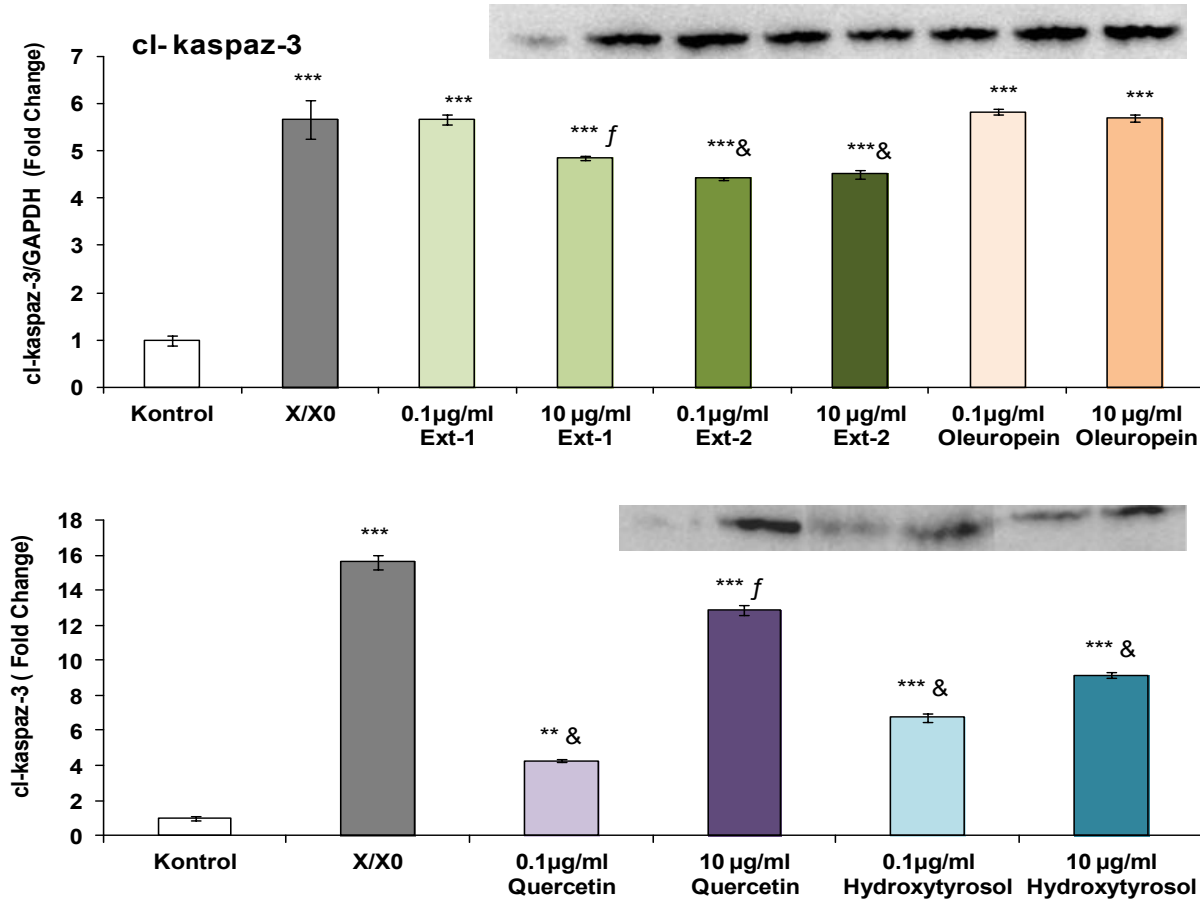
Şekil 4.6. X/XO'nun tek başına inkübasyonu sonrasında ve ekstreler ve polifenolik bileşiklerin her biri ile ön inkübasyonu takiben X/XO inkübasyonu sonrasında fosfo p44/p42-MAPK (ERK) protein düzeyleri. (ANOVA) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Kontrolle göre istatistiksel fark; ^f $p < 0.05$, [#] $p < 0.01$, [&] $p < 0.001$ X/XO oranla istatistiksel fark

4.7. H9c2 Hücrelerinde P-C-Jun Protein Düzeyleri: X/XO, Ekstreler ve Polifenolik Bileşiklerin Etkileri



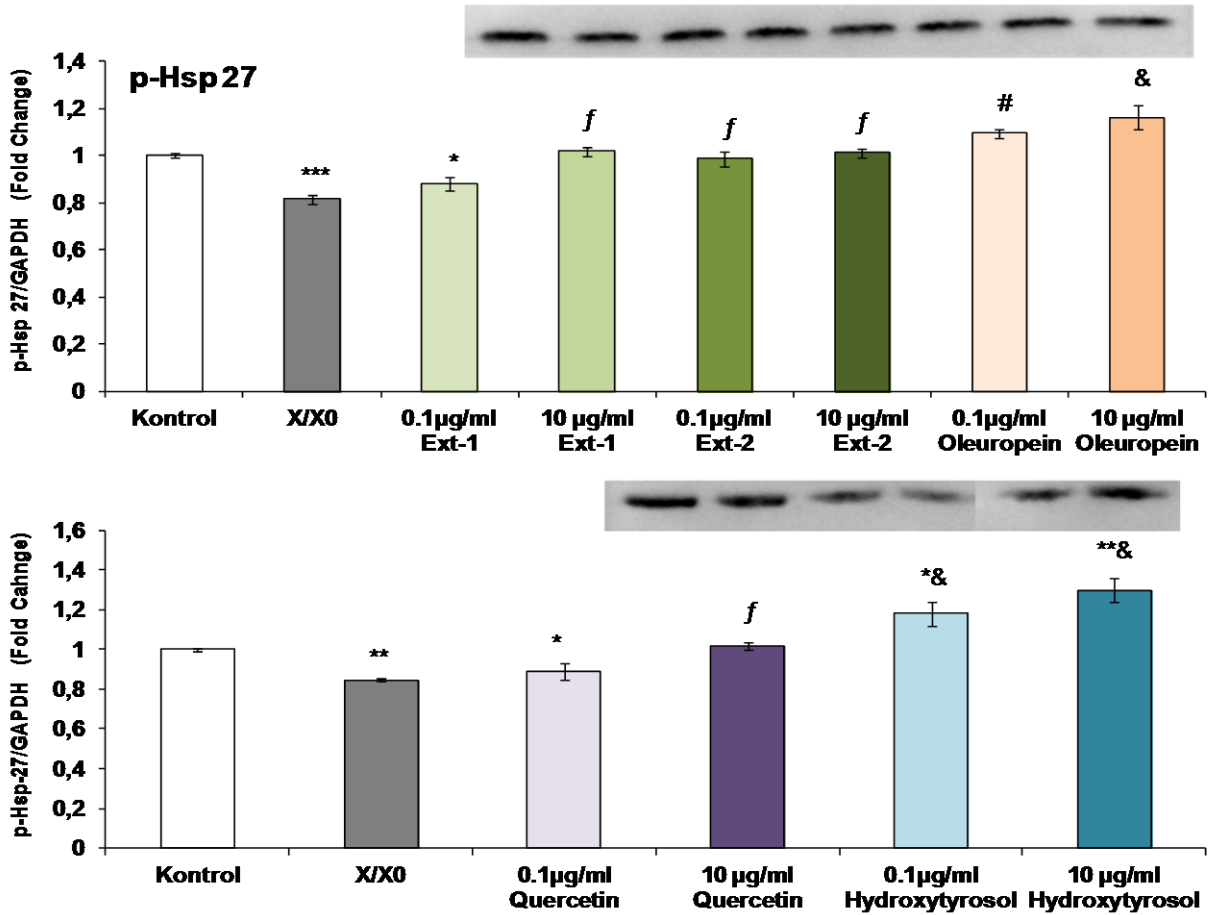
Şekil 4.7. X/XO'ın tek başına inkübasyonu sonrasında ayrıca ekstreler ve polifenolik bileşiklerin her biri ile ön inkübasyonu takiben X/XO inkübasyonu sonrasında p-c-Jun protein düzeyleri. (ANOVA) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Kontrolle göre istatistiksel fark; ^f $p < 0.05$, [#] $p < 0.01$, [&] $p < 0.001$ X/XO oranla istatistiksel fark

4.8. H9c2 Hücrelerinde Cl-Kaspaz-3 Protein Düzeyleri: X/XO, Ekstreler ve Polifenolik Bileşiklerin Etkileri



Şekil 4.8. X/XO'ın tek başına inkübasyonu sonrasında ayrıca ekstreler ve polifenolik bileşiklerin her biri ile ön inkübasyonu takiben X/XO inkübasyonu sonrasında cl-kaspaz-3 protein düzeyleri. (ANOVA) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Kontrole göre istatistiksel fark; ^f $p < 0.05$, [#] $p < 0.01$, [&] $p < 0.001$ X/XO oranla istatistiksel fark

4.9. H9c2 Hücrelerinde P-Hsp 27 Protein Düzeyleri: X/XO, Ekstreler ve Polifenolik Bileşiklerin Etkileri



Şekil 4.9. X/XO'ın tek başına inkübasyonu sonrasında ayrıca ekstreler ve polifenolik bileşiklerin her biri ile ön inkübasyonu takiben X/XO inkübasyonu sonrasında p-Hsp 27 protein düzeyleri. (ANOVA) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ Kontrole göre istatistiksel fark; *f* $p < 0.05$, # $p < 0.01$, & $p < 0.001$ X/XO oranla istatistiksel fark

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, H9c2 hücrelerinin X/XO (12 saat; 0.5 mM/5 mU ml) ile muamelesi, ROS oluşumunu arttırmış ve hücre canlılığını inhibe etmiştir. X/XO ile indüklenen ROS oluşumunun fenolik ekstreler ve fenolik bileşiklerce farklı şiddetlerde önlendiği ve hücre canlılığının bununla koşut olarak korunduğu gösterilmiştir. Genel olarak, polifenol içerikleri farklı olmakla birlikte, Ext-1 ve Ext-2 arasında canlılığın korunması ve ROS inhibisyonunun ölçüsü bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözükmemektedir.

Memelilerde hücresel strese (mekanik stres, oksidatif stres, oksidatif DNA hasarı) yanıt verebilirlik ve organik-hücresel düzeyde homeostazı sürdürebilirlik ölçüsü hastalıklardan korunmak için birincil kriterdir. Bu süreçlerde rol oynayan anahtar komponentlerde oluşan deregülasyon ve mutasyon, dejeneratif kronik hastalıklar, gelişimsel defektler ve tümörigenez ile sonuçlanmaktadır (Mao ve diğerleri, 2014). Bilimsel veriler, kardiovasküler hastalıkların patobiyolojisinde hücresel redoks stresin öncül oyuncularından biri olduğunu vurgulamaktadır. ROS ile tetiklenen hücre içi sinyalizasyon yolları, inflamasyon, platelet aktivasyonu, endotel ve kardiyomiyosit hasarı ve kontraktil disfonksiyonlar ile sonuçlanan transkripsiyonel ve epigenetik değişimleri harekete geçirerek organ yetmezliğine neden olur (Santilli ve diğerleri, 2014).

Ras/Raf proteinleri, MAPKK ve MEK kinazların aktive edilmesini uyarır. Bu kinazlar da, ERK aktivasyonunu uyarır. Mitojen ile aktive olan protein kinazlar (MAPK), serin-treonin protein kinaz ailesindendirler ve çok sayıda ekstraselüler uyarıcı ile aktive olurlar. Bunlardan üç majör alt grup karakterize edilmiştir: (1) Ekstraselüler sinyal ile regüle edilen kinaz (ERK) ki bu p42/44 MAPK olarak adlandırılır, (2) p38 MAPK, (3) JNK. Bunlar sonraki basamaklarda, uygun transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonları ile ard arda gerçekleşen ve hücresel proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz ile sonuçlanan işlemlere öncülük ederler (Nagai ve diğerleri, 2009). Mitojen ile aktive olan protein kinaz kinaz (yani (MAPK kinaz, MAPKK ve diğer bir gösterim ile MEK) ve MEK-ekstraselüler sinyal ile regüle edilen kinaz (ERK, ki bu p42/p44 MAPK olarak da adlandırılmaktadır) kardiyak hipertrofinin güçlü mediyatörleridir (Bueno ve diğerleri, 2000; Dong ve diğerleri, 2014).

Myokardiyal XO aktivitesinin iskemi/reperfüzyon (I/R) sonrasında arttığı bilinmektedir. Reoksijenasyona bağlı ROS artışı ve buna bağlı oksidatif stres p38 MAPK ile hücre içi Ca^{2+} artışına ve miyokard hasarına neden olmaktadır (Nelson ve diğerleri, 2002; Kang ve diğerleri, 2006; Miao ve diğerleri, 2013; Esmaili ve Sonboli 2010). MAPKAPK-2 (MAP kinase-activated protein kinase-2), insanda MAPKAPK-2 geni ile kodlanan bir enzimdir. Bu gen bazı Ser/Thr protein kinaz ailesini kodlamaktadır. MAPKAPK-2, p38 MAP kinaz (mitogen-activated protein kinase) tarafından doğrudan fosforile olur ve fosforile olmuş p-MAPKAPK-2, stres, inflamasyon ve hücre proliferasyonunun regülasyonu gibi çok sayıda hücresel süreçte rol oynar. H9c2 hücrelerinde yapılan çalışmalar, hücresel stres yapıcılara kısa süreli maruziyet sonrasında p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)'ın doğrudan aktive olduğu, ama kronik kalp yetmezliği oluşturmuş iskemik durumda ise, MAPKAPK-2'nin p38 MAPK aracılı fosforilasyonunda ise %50 civarında bir azalma olduğu gösterilmiştir (Lemke ve diğerleri, 2001). p38 MAPK aktivitesindeki artış kardiyomiyositlerde patolojik hipertrofiye ve yeniden biçimlenmeye (remodeling) aracılık eder ki MAPKAPK-2, p38 MAPK'nun oluşturduğu kardiyak patolojiden sorumlu önemli bir kaskad moleküldür (Streicher ve diğerleri, 2010). Öte yandan, izole edilmiş primer kardiyak miyositlerde ve intakt kalpte gösterildiği şekilde, p38-MAPK'nin, inflamatuvar sitokin TNF-alfa tarafından aktive edilmesinin kardiyodepresyona neden olduğu bildirilmiştir (Bellahcene ve diğerleri, 2006). Kalpte iskemi/reperfüzyon (I/R)'nın eşlik ettiği hasarda ROS'ların hasarı tetikleyen asıl oyuncular olduğu ve bu durumda aktive olmuş p38MAPK'ın mitokondriyal ROS düzeylerindeki artışa da yol açtığı önemli bir gerçektir (Ashraf ve diğerleri, 2014). Buna ek olarak, p38-MAPK, kardiyomiyositlerde JAK/STAT aktivasyonunun negatif düzenleyicisi olarak da rol oynar. IL-6 ailesi sitokinler, mitojen ve stres ile aktive olan protein kinazları (MAPKs/SAPKs) aktive ederler ki bunlar Erk1/2, JNK1/2, p38-MAPK, PI3K/Akt dir (Fahmi ve diğerleri, 2013).

Kardiyomiyosit büyüklüğü arttığında odacık kütlesi ve duvar kalınlığı artar; fizyolojik hipertrofi devamlı ekzersiz ve gebelik gibi durumlarda adaptif bir yanıt olarak artsa bile, uzun vadede kalbin kontraktıl fonksiyonlarının bozulmasına, hipertansiyona ve duyarlılık azalmasına neden olur. Burada özgün sinyalizasyon yolları adaptif yanıtları maladaptif durumlara karşı yönetmeye çalışırlar (Sugden ve diğerleri, 2007; Catalucci ve diğerleri, 2008). Aslında ROS ile aktive olan çok sayıda sinyalizasyon yolağı (ERK1/2, JNK, p38MAPK, Akt, PKCs, ve NF- κ B) kardiyomiyosit hipertrofisinde rol oynar. Aslında Akt ve NF- κ B, Nox2'yi de aktive

ederek de ROS artışına ve anjiyotensin-II aracılı kardiyak hipertrofiye eşlik ederler (Hingtgen ve diğerleri, 2006). Mekanik stresin zamanla oluşturduğu kardiyomiyopati de Rac1–ROS-‘a bağımlı yolları kapsar ki bu yolak da ERK1/2 ve p38MAPK’ın aktivasyonunu içerir ve Nox2 aktivasyonu ile karakterizedir (Aikawa ve diğerleri, 2001; Pimentel ve diğerleri, 2006). Bununla birlikte, uzun vadede kronik basınç yüklenmesini takiben kardiyomiyositlerde, Nox4’e bağımlı koruyucu bir yolak da keşfedilmiştir (Ago ve diğerleri, 2010). Miyokard iskemisinden sonra gelen basınç artışıyla birlikte Nox4 düzeyleri artar ve Nox4’ün Nox2 yanıtını ve dolayısı ile basınç yüklenmesine bağlı hipertrofiyi ayarlamaya yönelik kompensetuvar bir mekanizma olduğu da öne sürülmektedir (Byrne ve diğerleri, 2003; Looi ve diğerleri, 2008; Celio ve diğerleri, 2011). Ayrıca, Nox4 çoğunlukla H_2O_2 oluştururken, Nox-2, $O_2^{\bullet-}$ oluşturmaktadır (Martyn ve diğerleri, 2006).

Çalışmamız yukarıda açıklanan araştırmaların bulgularıyla uyumaktadır. Şöyleki, süperoksit anyon radikali oluşturucu X/XO varlığında MAPKAPK-2’nin p38 MAPK aracılı fosforilasyonu artmış ve antioksidan ekstreler ve polifenolik bileşikler bu artışı önlemişlerdir. P38 ve ilişkili sinyal yollarının aktivasyonları uzun vadede hipertrofik ve proapoptotik oldukları için kardiyomiyosit sağlığının X/XO varlığında sürdürülmesi için P38 ve ilişkili sinyal yollarının inhibisyonları önemlidir (Bao et al. 2007; Scharf et al. 2013). Süperoksit anyon radikali bir radikal olmakla birlikte yarılanma ömrü çok kısa olduğu için çok zararlı değildir. Ancak H_2O_2 kaynağı olması ve geçiş metallerini indirgeyebilmesinden dolayı oldukça önemlidir. İki molekül süperoksit proton alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dönüşür (Nodberg ve Arner, 2001). Dolayısıyla, X/XO varlığında oluşan oksidatif stresin kaynağının bir anlamda H_2O_2 olduğu düşünülebilir. Laboratuvarımızda yapılan önceki araştırmalar zeytin polifenolik bileşiklerinin H_2O_2 ile indüklenen oksidatif strese ve redoks kaosa ve sitotoksositeye karşı farklı hücre tiplerini in vitro olarak koruduğunu ortaya koymuştur (Cumaoglu ve diğerleri, 2011(a); Cumaoglu ve diğerleri, 2011(b); Torul ve diğerleri, 2015). Öte yandan, bir karbonil bileşiği, lipid peroksidasyonun erken dönemde oluşan aldehit ürünü olan 4-hidroksinonenal (4-HNE) ile H9c2 hücrelerinde oluşan stres ile apoptotik transkripsiyon faktörlerinde saptanan indüksiyon, zeytin polifenolik bileşiklerinin ön inkübasyonu sonucunda farklı konsantrasyon ve farklı derecelerde inhibe edilmiştir (Bali ve diğerleri, 2014).

Çalışmamız, X/XO tarafından phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)'nin indüklendiğini ortaya koymuştur. Quercetin bu indüksiyonu önlerken, ilginç olarak ekstreler ve diğer fenolik bileşikler (10 µg/ml) özellikle ERK2'nin indüksiyonunu X/XO varlığında arttırmışlardır. Ras-Raf-MEK-ERK sinyalizasyon yolağının kontrol edilemeyen indüksiyonu hipertrofik kardiyomiyopatiyi tetikliyor olsa bile bu yolağın inhibisyonu ise stres altındaki kardiyomiyositleri ölüme daha yatkın kılar (Wang, 2007). Bu nedenle, sağkalım proteinleri olarak bilinen ERK'lerin stres altındaki indüksiyonları normaldir ve polifenoliklerin bazıları tarafından bu indüksiyonun artarak sürdürülmesi sağkalım sürecine katkı olarak yorumlanabilir. HUVEC'de yapılan önceki çalışmalar, ortamda $O_2^{\bullet-}$ donörleri LPC ve X/XO varken p38 aktivasyonunun arttığı ve ERK1/2 fosforilasyonunun azaldığını göstermektedir (Choi ve diğerleri, 2010).

Uyarılmış ERK, bazı sitozolik ve nükleer proteinlerin fosforilasyonuna neden olur. Bu proteinler, bu tezde X/XO, ekstreler ve polifenolik bileşikler varlığında düzeylerini değerlendirdiğimiz c-Jun ve diğerleridir (c-Myc, ATF2, Elk1, NF-κB ve cFos). c-Jun bir transkripsiyon faktörü olup hücre çoğalması, özellikle G1 fazının atlatılması, hücre göçü ve farklılaşmasında etkin rol oynamaktadır (Sacco ve diğerleri, 2012; Adjei, 2001). Deneylerimiz sonucunda, stresle indüklenen apoptoz ve hücre proliferasyonunun düzenleyicisi olan c-Jun fosforilasyonunun X/XO varlığında azaldığı ve Ext-1 (0,1 µg/ml – 10 µg/ml), Ext-2 (0,1 µg/ml) varlığında bu azalmanın önlendiği, bulunmuştur. Bu azalma özellikle Ext-1 ve quercetin (0,1 µg/ml – 10 µg/ml) tarafından önlenmiştir. H9c2 hücrelerinde X/XO indüksiyonu sonucu c-jun fosforilasyonunu inceleyen bir çalışmaya rastlamamamıza karşın, endotel hücrelerinde X/XO'nun c-Jun düzeylerini ve AP-1 transkripsiyonel aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Matesanz ve diğerleri, 2007). Araştırmacılar, damar düz kasında, X/XO'a uzun süreli maruziyetin hipertrofik etkiler oluşturduğunu; hipertrofik kardiyak hastalıkların XO aktivitesindeki artış ile ilişkili olduğunu; MAPK aktivasyonu, AP-1 aktivitesi ve hücre büyüklüğü üzerinde X/XO'nun etkilerinin ekstraselüler ortamdan süperoksit anyonu $O_2^{\bullet-}$ salıverilmesiyle ilişkili olduğunu ve bu durumun X/XO inhibitörü allopurinol ile önlendiğini bildirmişlerdir (Matesanz ve diğerleri, 2007). Bizim çalışmamızda X/XO varlığında neden c-Jun fosforilasyonunun azalmış olduğu tam olarak bilinmemekle birlikte, deney ortamındaki X/XO'nun miktarı ve süresi ile ilişkili olarak miktarı artmış $O_2^{\bullet-}$ 'e yanıt olarak gelişebilecek proliferasyon ve hipertrofiye karşı kardiyomiyositlerde kompensatuvar bir mekanizma olarak ortaya çıkmış olabileceği biçiminde yorumlanabilir. Destekler nitelikte,

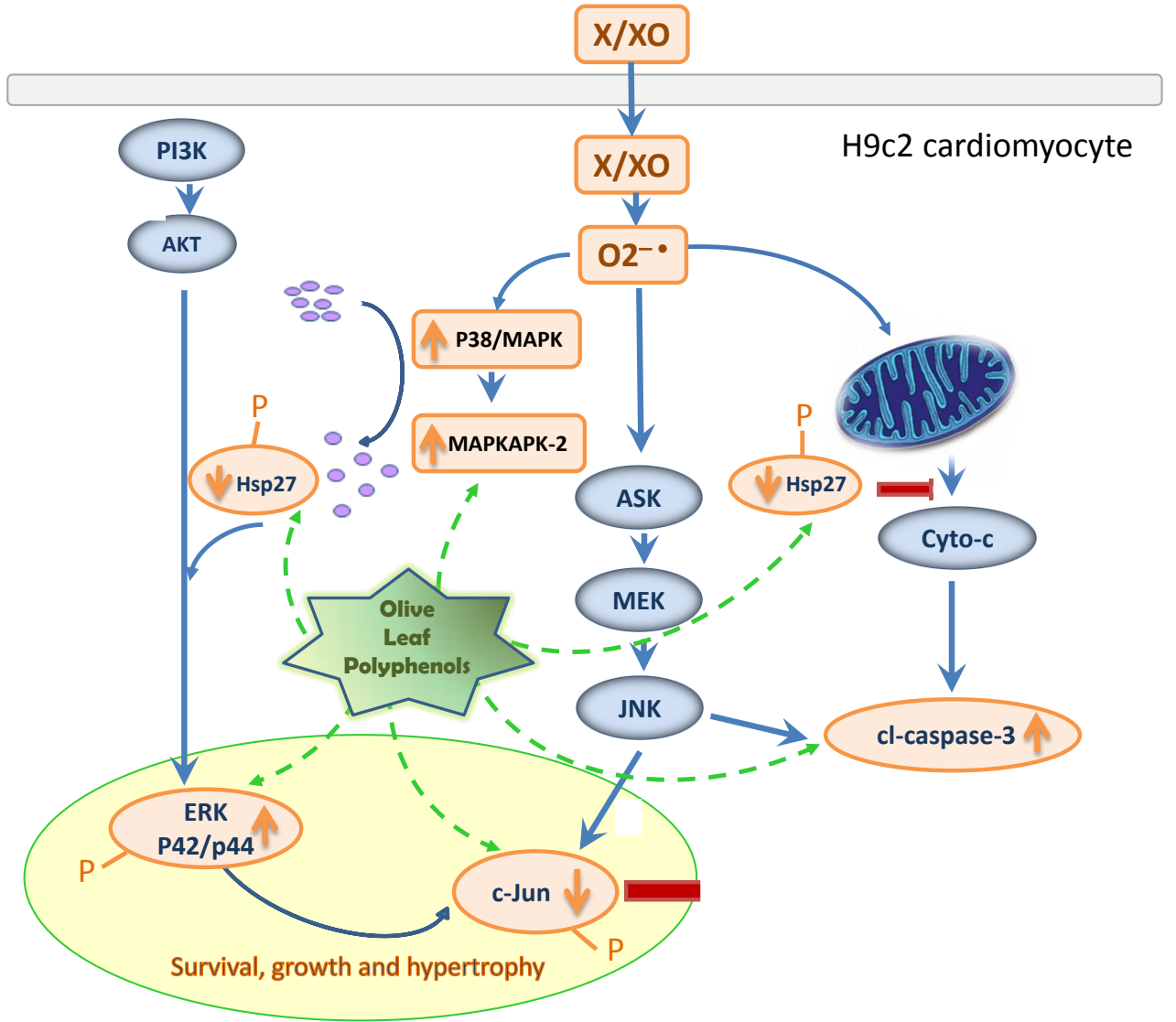
X/XO stresi altında c-Jun N-terminal kinazların kardiyomiyosit apoptozunu önlemek ve infarkt alanının genişlemesini engellemek amacıyla azaldığı gösterilmiştir (Ferrandi ve diğerleri, 2004). Angiotensin II mitojen ile aktive olan protein kinazların (MAPKs) iyi bilinen bir aktivatörüdür ve kardiyomiyositlerde oksidatif stres aracılı proliferasyonu ve hipertrofiyi tetikler (Santos ve diğerleri, 2011)

Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz, doku homeostazı için gerekli morfolojik ve biyokimyasal değişiklikleri içeren fizyolojik bir olaydır. Hücre proliferasyonunun, farklılaşmasının ve apoptozun koordinasyonu, doku gelişmesi ve homeostazının normal ve stres koşullarında sürdürülmesini sağlar. Hücrelerin apoptoza yönelmesi sırasında içsel ve dışsal apoptotik yollar ve çeşitli kontrol mekanizmaları görev almaktadır (Reed ve diğerleri, 2004). Gerek içsel (intrensik) gerekse dışsal (ekstrensik) yolda kaspazlar adı verilen sistein-proteaz grubu enzimler önemli rol oynar. Öncelikli olarak inaktif proteinler olarak sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edilirler. Daha sonra hücresel hedeflerdeki tetrapeptit motifleri tanıyarak ve mevcut substratı bir karboksil tarafından ayırarak hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok hücresel ve şekilsel değişimler, bu enzimlerin rol oynadığı birtakım süreçler neticesinde gelişir. Memelilerde yaklaşık 14 kaspaz tanımlanmıştır (Lamkanfi ve diğerleri, 2007). Kaspaz-3 hem içsel hem de dışsal yolda rolü olan bir enzimdir. İçsel yolda aktive olan kaspaz-9, kaspaz-3 aktivasyonunu uyararak hücrenin düzenleyici ve yapısal moleküllerinin parçalanmasına aracılık eder (Hengartner, 2000). Dışsal yolda ise aktif kaspaz-8 tarafından bir proenzim halinde iken aktive edilir (Donepudi ve diğerleri, 2003). Kardiyak miyositlerdeki apoptoz, dışsal yolda kaspaz-3'ün TNF α aracılı aktivasyonuna ve hücre içi proteinlerin lizisine dayalıdır. İçsel yolda ise mitokondri membranının geçirgenliğinin artarak sitokrom-c'nin dışa salınması söz konusudur ve sitokrom-c, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1, dATP, and kaspaz-9 ile birlikte apoptozom kompleksinin oluşmasına neden olur ve bu kompleks kaspaz-3'ü aktive eder (van Empel ve diğerleri, 2005; Foo ve diğerleri, 2005; Nadruz, 2015). Oksidanların oluşturduğu endoplazmik retikulum (ER) stresi ve buna bağlı kalıcı dejenerasyonlar bu bağlamda kardiyovasküler hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (Sözen ve diğerleri, 2014). ER stres, apoptozun içsel yolağına eşlik eder ve bir transkripsiyon faktörü olan GADD153/CHOP (büyümenin durması ve DNA hasarı, CHOP olarak da adlandırılmaktadır) ve JNK yolağı bu süreçte önemli rol oynar (Li ve Holbrook, 2001). Çalışmamızda pro-apoptotik (bölünmüş) cleaved caspase-3 aktivitesi X/XO stimülasyonu ile artmıştır ve bu

hücrelerin apoptoza sürüklendiğinin önemli bir göstergesidir. Kullandığımız her bir ekstre ya da polifenolik bileşik ile ön inkübasyon bu artışı anlamlı olarak önlemiştir. Artan kanıtlar, kardiyomiyosit konjestif kalp yetmezliğinde kardiyomiyosit apoptozunun arttığını ortaya koymaktadır (Kwak 2013).

Isı şoku proteini HSP-27 (Heat shock protein HSP27), MAPKAPK-2'nun in vivo substratlarından biridir (Chevalier ve Allen, 2000). Antiapoptotik protein olarak bilinen HSP27'nin aşırı indüksiyonu kardiyak hipertrofiye neden olmaktadır. Çalışmamızda X/XO varlığında HSP27 proteininin ifadenmesi inhibe olmuştur. Ekstreler ve quercetin inhibisyonu tamamen önlemiştir. Özellikle hidroksitirozol ve oleuropein öninkübasyonu ile bu inhibisyon hatta bir miktar indüklenmiştir. Bu yanıt, X/XO aracılığı ile giderek artan strese karşı kardiyomiyositleri koruma adına gelişmiş bir yanıt olarak yorumlanmaktadır.

Konu ile ilgili gelişmiş deneysel çalışmalar olmamakla birlikte, Du ve diğerleri, kateşin, prosiyanidin ve üzüm çekirdeği ekstresinin, H9c2 hücrelerinde X/XO aracılı oksidatif stresi, apoptozu önlediklerini ve stres altında indüklenen endojen antioksidan enzim düzeylerini normale döndürdüklerini gözlemlemişlerdir (Du ve diğerleri, 2007). Benzer şekilde, güçlü bir antioksidan olan lipoik asid, H9c2 hücrelerinin canlılığını (viability) X/XO'nun sitotoksik etkilerine karşı korumuş ve endojen antioksidan savunmanın X/XO'a karşı aktive olmasını engellemiştir (Cao ve diğerleri, 2003). Bir başka polifenolik bileşik resveratrol, H9c2 kardiyomiyosit kültürlerinde X/XO ile tetiklenen hücre içi ROS oluşumunu inhibe etmiş ve canlılığı korumuştur (Cao ve Li, 2004). İyi bilinen kardiyotonik etkili Boerhaavia diffusa'dan elde edilen etanolik ekstre H9c2 hücrelerinde, XO, lipid peroksidasyon, karbonil ve ROS düzeylerini azaltmış, NF-kB ekspresyonunu inhibe etmiştir (Prathapan ve diğerleri, 2013). Polifenolik bileşikler bakımından zengin olan elma kabuğu ekstresinin, H9c2 hücrelerinde superoksit ve hidroksil radikali söndürücü aktivite gösterdiği, apoptotik belirteç kaspaz-3 ekspresyonunu inhibe ettiği yayımlanmıştır (Vineetha ve diğerleri, 2014).



Şekil 5.1. X/XO'ın oluşturduğu oksidatif strese karşı zeytin yaprağı polifenolik bileşiklerinin antiapoptotik ve antiproliferatif ve kardiyomiyosit koruyucu etkilerinin mekanizmaları.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

X/XO ile indüklenen stres ve sitotoksosite modelinde zeytin yaprağı ve içeriğinde bulunan oleuropein, hidroksitirozol ve kersetin polifenolik bileşiklerinin kardiyomiyosit koruyucu etkileri ve moleküler etki mekanizmaları *in vitro* olarak ilk kez bu tez çalışmasında gösterilmiştir. Zeytin yaprağı polifenolleri kardiyomiyositleri hem süperoksit aracılı indüklenmiş apoptozdan hem de artmış proliferasyona bağlı hipertrofiye karşı koruma eğilimindedirler. Etkiyi oluşturan hücre içi sinyal yollarındaki kritik proteinler düzeyinde sonuç ortaya koyan bu çalışma, ki çalışmamızın bulguları Şekil 5.1.'de şematize edilmiştir, halen holistik düzeyde kardiyoprotektif olarak kullanılan zeytin yaprağı ürünlerinin neden etkili olabildiklerine moleküler açıklamalar getirmekte ve kanıtlar sunmaktadır. Bizim bulgularımız, polifenolik bileşikler ve özellikle oleuropein bakımından standardize edilmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının ve/veya içeriği oluşturan fenolik fitokimyasallarının (oleuropein, hidroksitirozol, quercetin vb) kardiyoprotektif amaçla “nutrasötik” kullanımını desteklerken, gelecekte ilaç kategorisinde değerlendirilmesine yönelik olası preklinik çalışmalar için yön verici ışık tutucu niteliktedir.

KAYNAKLAR

- Ahmed, K.M. (2013). The effect of olive leaf extract in decreasing the expression of two pro-inflammatory cytokines in patients receiving chemotherapy for cancer. A randomized clinical trial. **The Saudi Dental Jurnal**. 25(4):141-7.
- Adjei, A.A. (2001). Ras signaling pathway proteins as therapeutic targets. **Current Pharmaceutical Design**, 7,1581-1594.
- Ago, T., Kuroda, J., Pain, J., Fu, C., Li, H., Sadoshima, J. (2010). Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. **Circulation Research**. 106:1253–1264.
- Aikawa, R.,Nagai, T., Tanaka, M., Zou, Y., Ishihara, T., Takano, H., Hasegawa, H.,Akazawa, H., Mizukami, M., Nagai, R., Komuro, I.(2001).Reactive oxygen species in mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 289:901–907.
- Ajiboye, T.O., Yakubu, M.T., Oladiji, A.T.(2014). Cytotoxic, antimutagenic, and antioxidant activities of methanolic extract and chalcone dimers (lophirones B and C) derived from *Lophira alata* (Van Tiegh. Ex Keay) stem bark
- Amin, A., Khan. M.A., Shah, S., Ahmad, M., Zafar, M., Hameed, A.(2013). Inhibitory effects of *Olea ferruginea* crude leaves extract against some bacterial and fungal pathogen. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. 26(2):251-4.
- Ardalan, M.R., Rafieian-Kopaei, M. (2013). Antioxidant supplementation in hypertension. **Journal Of Renal Injury Prevention**. 3;3(2):39-40.
- Arushanian É.B, Naumov SS.(2013). Anti-inflammatory potential of melatonin. **Clinical Medicine (Moskova)**. 91(7):18-22.
- Aschermann, M., Jansa, P. (2014). Drug therapy of pulmonary arterial hypertension in 2014. **Vnitřní Lékarství**. 60(4):282-8.
- Ashraf, M.I., Ebner, M., Wallner, C., Haller, M., Khalid, S., Schwelberger, H., Koziel, K., Enthammer, M., Hermann, M., Sickinger, S., Soleiman, A., Steger, C., Vallant, S., Sucher, R., Brandacher, G., Santer, P., Dragun, D., Troppmair, J1. (2014) A p38MAPK/MK2 signaling pathway leading to redox stress, cell death and ischemia/reperfusion injury. 14;12:6. doi: 10.1186/1478-811X-12-6.
- Assini, J.M., Mulvihill, E.E., Huff, M.W. (2013). Citrus flavonoids and lipid metabolism. **Current Opinion Lipidology** 24(1):34-40.
- Avior, Y., Bomze, D., Ramon, O., Nahmias, Y. (2013). Flavonoids as dietary regulator of nuclear activity. **Food&Function**. 4(6):831-4
- Aviram, M., Rosenblat, M. (2013). Pomegranate for your cardiovascular health. **The Rambam Maimonides Medical Journal**. 30;4(2):e0013. doi: 10.5041/RMMJ.10113.

- Baba, S., Osakabe, N., Kato, Y., Natsume, M., Yasuda, A., Kido, T., Fukuda, K., Muto, Y., Kondo, K. (2007). Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 85(3):709-17.
- Babu, P.V., Liu, D., Gilbert, E.R. (2013). Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 24(11):1777-89
- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Azizi, F. (2013). Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of & Diabetes Metabolic Disorders*. 13;12(1):43
- Bahramsoltani, R., Farzaei, M.H., Rahimi, R. (2014). Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. *Archives of Dermatological Research*. 306(7):601-17.
- Bali, E.B., Ergin, V., Rackova, L., Bayraktar, O., Küçükboyacı, N., Karasu Ç. (2014). Olive leaf extracts protect cardiomyocytes against 4-hydroxynonenal-induced toxicity in vitro: comparison with oleuropein, hydroxytyrosol, and quercetin. *Planta Medica*. 80(12):984-92. doi: 10.1055/s-0034-1382881. Epub
- Balková, P., Hlaváčková, M., Milerová, M., Neckář, J., Kolář, F., Novák, F., Nováková, O. (2011). N-acetylcysteine treatment prevents the up-regulation of MnSOD in chronically hypoxic rat hearts. *Physiological Research*. 60(3):467-74.
- Bao, W1., Behm, D.J., Nerurkar, SS., Ao, Z., Bentley, R., Mirabile, R.C., Johns, D.G., Woods, T.N., Doe, C.P., Coatney, R.W., Ohlstein, J.F. (2007). Effects of p38 MAPK Inhibitor on angiotensin II-dependent hypertension, organ damage, and superoxide anion production. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 49:362-368.
- Bao, Q., Pan, J., Qi, H., Wang, L., Qian, H., Jiang, F., Shao, Z., Xu, F., Tao, Z., Ma, Q., Nelson, P., Hu, X. (2014) Aging and age-related diseases - From endocrine therapy to target therapy. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 25;394(1-2):115-118.
- Baradaran, A., Nasri, H., Rafieian-Kopaei, M. (2014). Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *International Journal of Research in Medical Sciences*. 19(4):358-67.
- Barbaro, B., Toietta, G., Maggio, R., Arciello, M., Tarocchi, M., Galli, A., Balsano, C. (2014). Effects of the Olive-Derived Polyphenol Oleuropein on Human Health. *International Journal Molecular Science*. 14;15(10):18508-18524.
- Baycin, D., Altiok, E., Ulku, S., Bayraktar, & O. (2007). Adsorption of olive leaf (*Olea europaea* L.) antioxidants on silk fibroin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1227-1236.

- Bellahcene, M1., Jacquet, S., Cao, X.B., Tanno, M., Haworth, R.S., Layland, J., Kabir, A.M., Gaestel, M., Davis, R.J., Flavell, R.A., Shah, A.M., Avkiran, M., Marber, M.S. (2006). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to the early cardiodepressant action of tumor necrosis factor. ***The American Journal of College Cardiology***. 1;48(3):545-55.
- Benzie, I.F., Choi, S.W. (2014). Antioxidants in food: content, measurement, significance, action, cautions, caveats, and research needs. ***Advances in Food and Nutrition Research***.;71:1-53.
- Bennani-Kabchi, N., Fdhil, H., Cherrah, Y., Kehel, L., el Bouayadi, F., Amarti, A., Saïdi, M., Marquié, G. (1999) Effects of *Olea europea* var. *oleaster* leaves in hypercholesterolemic insulin-resistant sand rats. ***Thérapie***. 54(6):717-23.
- Bhardwaj, P., Khanna, D., Balakumar, P. (2014). Catechin averts experimental diabetes mellitus-induced vascular endothelial structural and functional abnormalities. ***Cardiovascular Toxicology***. 14(1):41-51.
- Bhullar, K.S., Rupasinghe H.P. (2015). Antioxidant and cytoprotective properties of partridgeberry polyphenols. ***Food Chemistry***. 1;168:595-605.
- Bian, K., Doursout, M.F., Murad, F. (2008). Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. ***Journal Clinical Hypertension (Greenwich)***. 10(4):304-10.
- Bielak-Zmijewska, A., Grabowska, W., Przybylska, D.(2014). Impact of cellular senescence on organismal aging and age-related diseases. ***Postepy Biochem***. 60(2):147-60.
- Bijak, M1., Saluk, J., Tsigotis-Maniecka, M., Komorowska, H., Wachowicz, B., Zaczyńska, E., Czarny, A., Czechowski, F., Nowak, P., Pawlaczyk, I.(2013). The influence of conjugates isolated from *Matricaria chamomilla* L. on platelets activity and cytotoxicity. ***International Journal of Biological Macromolecules***. 61:218-29.
- Bisceglia, M., Carosi, I., D'Errico, M., Di Giorgio, G., Castagnoli, A., Pasquinelli, G.(2011). Lipofuscin-like granules of the juxtaglomerular apparatus of the kidney. The diagnostic significance of a quasi-normal subcellular structure incidentally encountered in the course of routine ultrastructural evaluation of renal biopsies. ***Pathology - Research and Practice***. 15;207(2):79-85
- Bizzarri, M., Proietti, S., Cucina, A., Reiter, R.J. (2013). Molecular mechanisms of the proapoptotic actions of melatonin in cancer: a review. ***Expert Opinion on Therapeutic Targets***. 17(12):1483-96.
- Boda, D. (2011). Results of and further prevention of hypoxic fetal brain damage by inhibition of xanthine oxidase enzyme with allopurinol. ***Journal of Perinatal Medicine***. 39(4):441-4.
- Boisard, S., Le Ray, A.M., Gatto, J., Aumond, M.C., Blanchard, P., Derbré, S., Flurin, C., Richomme, P.(2014) Chemical composition, antioxidant and anti-AGEs activities of a French poplar type propolis. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***. 12;62(6):1344-51

- Borchert, G.H., Hlaváčková, M., Kolář, F. (2013). Pharmacological activation of mitochondrial BK(Ca) channels protects isolated cardiomyocytes against simulated reperfusion-induced injury. *Experimental Biology and Medicine*. (Maywood). 238(2):233-41.
- Bornhoeft, J1., Castaneda, D., Nemoseck, T., Wang, P., Henning, S.M., Hong, M.Y.(2012) The protective effects of green tea polyphenols: lipid profile, inflammation, and antioxidant capacity in rats fed an atherogenic diet and dextran sodium sulfate. *Nutritional Neuroscience*. 15(3):134-49. doi: 10.1179/1476830512Y.0000000006.
- Bouallagui, Z., Han, J., Isoda, H., Sayadi, S. (2011). Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. 49(1):179-84
- Bueno, OF., De Windt, L.J., Tymitz, K.M., Witt, S.A., Kimball, T.R., Klevitsky, R.(2000). The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice.*EMBO Journal*.19: 6341-6350.
- Byrne, J. A., Grieve, D. J., Bendall, J. K. Li, J. M. Gove, C., Lambeth, J. D., Cave, A. C., Shah, A. M.(2003). Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circulation. Research*. 93:802–805
- Cabarkapa, A., Zivković, L., Zukovec, D., Djelić, N., Bajić, V., Dekanski, D., Spremo-Potparević, B. (2014). Protective effect of dry olive leaf extract in adrenaline induced DNA damage evaluated using in vitro comet assay with human peripheral leukocytes. *Toxicology in Vitro*. 28(3):451-6. doi: 10.1016
- Campos, J., Schmeda-Hirschmann, G., Leiva, E., Guzmán, L., Orrego, R., Fernández, P., González, M., Radojkovic, C., Zuñiga, FA., Lamperti, L., Pastene, E., Aguayo, C.(2014). Lemon grass (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf) polyphenols protect human umbilical vein endothelial cell (HUVECs) from oxidative damage induced by high glucose, hydrogen peroxide and oxidised low-density lipoprotein. *Food Chemistry*. 15;151:175-81. Doi
- Cao, Z., Li, Y. (2004). Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. *European Journal of Pharmacology*. 5;489(1-2):39-48.
- Cao, Z1., Tsang, M., Zhao, H., Li, Y.(2004). Induction of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by alpha-lipoic acid in rat cardiac H9C2 cells: protection against oxidative injury. *European Journal of Pharmacology*. 5;489(1-2):39-48.
- Carlsson, L., Duker, G., Jacobson, I.(2010). New pharmacological targets and treatments for atrial fibrillation. *Trends in Pharmacological Sciences*. 31(8):364-71.
- Catalucci, D., Latronico, M. V., Ellingsen, O., Condorelli, G.(2008). Physiological myocardial hypertrophy: how and why? *Frontiers in Bioscience*. 13:312–324
- Castro, M. D. L., Japon-Lujan, R. (2006). State-of-the-art and trends in the analysis of oleuropein and derivatives. *Trends in Analytical Chemistry*, 25(5): 501-510.

- Celio, X.C. S., Anilkumar, N., Zhang, M., Brewer, A. C., Shah A.M. (2011). Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radical Biology & Medicine*.1,;50(7):777–793.doi: 10.1016/
- Chevalier, D1., Allen, B.G.(2000). Two distinct forms of MAPKAP kinase-2 in adult cardiac ventricular myocytes. *Biochemistry*. 23;39(20):6145-56.
- Choi, S1., Park, S., Liang, G.H., Kim, J.A., Suh, S.H.(2010). Superoxide generated by lysophosphatidylcholine induces endothelial nitric oxide synthase downregulation in human endothelial cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*. ;25(2-3):233-40. doi: 10.1159/000276557.
- Cemeroğlu, A.P., Cemeroğlu, B.S. (1998). Sağlık açısından gıda fenolikleri. *Gıda Teknolojisi* 3(9),52-55.
- Ceriello, A.(2006). Controlling oxidative stress as a novel molecular approach to protecting the vascular wall in diabetes. *Current Opinion Lipidology*.17: 510-8.
- Ceylan-Isik, A., Hünkar, T., Aşan, E., Kaymaz, F., Ari, N., Söylemezoğlu, T., Renda, N., Soncul, H., Bali, M., and Karasu, C.(2007) Cod liver oil supplementation improves cardiovascular and metabolic abnormalities in streptozotocin diabetic rats. *The Journal of Pharmacy And Pharmacology*. 59(12):1629-41.
- Ceylan-Isik, A.F., Ari, N., Stefek, M., Sotnikova, R., Ozansoy, G., Horakova, L., and Karasu Ç. (2011). Effects of a long-term treatment with an antioxidant pyridindole on vascular responsiveness in diabetes-induced aging rats. *Current Aging Science*. 4(2):150-7.
- Cheeseman, K.H., and Slater, TF. (1993) introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*. 49(3):481-93.
- Chen, D1., Dou, Q.P.(2008) Tea polyphenols and their roles in cancer prevention and chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 9(7):1196-206. doi: 10.3390/ijms9071196.
- Chen, J1., Zhang, Z2. and Cai, L1.(2014). Diabetic cardiomyopathy and its prevention by nrf2: current status. *Diabetes & Metabolism Journal*. 38(5):337-45. doi: 10.4093/
- Chiva-Blanch, G., Arranz, S., Lamuela-Raventos, R.M. and Estruch R.(2013) Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: *Evidences From Human Studies*. *Alcohol Alcohol*. 48(3):270-7.
- Corti, R1., Flammer, A.J., Hollenberg, N.K. and Lüscher T.F.(2009). Cocoa and cardiovascular health. *Circulation*. 17;119(10):1433
- Csiszár, A., Csiszar, A., Pinto, J.T., Gautam, T., Kleusch, C., Hoffmann, B., Tucsek, Z., Toth, P., Sonntag, W.E. and Ungvari, Z.(2014). Resveratrol Encapsulated in Novel Fusogenic Liposomes Activates Nrf2 and Attenuates Oxidative Stress in Cerebromicrovascular Endothelial Cells From Aged Rats.*The Journal of Gerontology*.

- Cui, X., Liu, X., Feng, H., Zhao, S. and Gao, H. (2012). Grape seed proanthocyanidin extracts enhance endothelial nitric oxide synthase expression through 5'-AMP activated protein kinase/Sirtuin 1-Krüppel like factor 2 pathway and modulate blood pressure in ouabain induced hypertensive rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 35(12):2192-7.
- Cumaoğlu, A., Ari, N., Kartal, M. and Karasu Ç. (2011) Polyphenolic extracts from *Olea europaea* L. protect against cytokine-induced β -cell damage through maintenance of redox homeostasis. **Rejuvenation Research**. 14(3):325-34. doi: 10.1089/rej.2010.1111.
- Cumaoğlu, A., Rackova, L., Stefek, M., Kartal, M., Maechler, P. and Karasu C. (2011). Effects of olive leaf polyphenols against H_2O_2 toxicity in insulin secreting β -cells. **Acta Biochimica Polonica**.;58(1):45-50.
- Dai, D.F., Chiao, Y.A., Marcinek, D.J., Szeto H.H. and Rabinovitch, P.S. (2014). Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. **Longev Healthspan**. 1;3:6.
- Dai, J., Mumper, R.J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**. 15(10):7313-52. doi: 10.3390/molecules15107313.
- Daleprane, J.B., Freitas, Vda S., Pacheco, A., Rudnicki, M., Faine, L.A., Dörr, F.A., Ikegaki, M., Salazar, L.A., Ong, T.P. and Abdalla, D.S. (2012). Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. 23(6):557-66
- Das Evcimen, N., Ulusu, N.N., Karasu, C., Doğru, B. (2004). Adenosine triphosphatase activity of streptozotocin-induced diabetic rat brain microsomes. Effect of vitamin E. **General Physiology Biophysics**. 23(3):347-55.
- Dasari, A., Bartholomew, J.N., Volonte, D., Galbiati, F. (2006). Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements. **Cancer Research**. 15;66(22):10805-14.
- de Bock, M., Derraik, J.G., Brennan, C.M., Biggs, J.B., Morgan, P.E., Hodgkinson, S.C., Hofman, P.L. and Cutfield, W.S. (2013). Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. **PLoS One**.;8(3):e57622. doi: 10.1371/journal.pone.0057622
- de Castro, A.L., Tavares, A.V., Campos, C., Fernandes, R.O., Siqueira, R., Conzatti, A., Bicca, A.M., Fernandes, T.R., Sartório, C.L., Schenkel, P.C., Belló-Klein, A. and Rosa Araujo, A.S. (2014). Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 25;391(1-2):22-9.
- Dekanski, D., Selaković, V., Piperski, V., Radulović, Z., Korenić, A. and Radenović, L. (2011). Protective effect of olive leaf extract on hippocampal injury induced by transient global cerebral ischemia and reperfusion in Mongolian gerbils. **Phytomedicine**. 15;18(13):1137-43. doi: 10.1016/j.phymed.2011.05.010. Epub 2011 Jul 14.

- Demiryürek, A.T., Karasu, C., Stefek, M., Stolc, S.(2004). Effect of stobadine on leukocyte free radical generation in streptozotocin-diabetic rats: comparison with vitamin E. **Pharmacology**. ;70(1):1-4.
- Denis, M.C1., Furtos, A., Dudonné, S., Montoudis, A., Garofalo, C., Desjardins, Y., Delvin, E. and Levy, E. (2013).Apple peel polyphenols and their beneficial actions on oxidative stress and inflammation. **PLoS One**. ;8(1):e53725. doi: 10.1371/journal.pone.0053725. Epub.
- Dikalov, S.I1. and Ungvari, Z.(2013). Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension. **The American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**. 15;305(10):H1417-27. doi: 10.1152/ajpheart.00089. Epub
- Dröge, W. (2002).Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Reviews**. ;82(1):47-95.
- Dogru Pekiner, B., Daş Evcimen, N., Ulusu, NN., Bali, M., Karasu, C. (2003). Effects of vitamin E on microsomal Ca(2+) -ATPase activity and calcium levels in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. **Cell Biochemistry and Function**.;21(2):177-82.
- Donepudi, M., Sweeney, A., Briand, C., and Grutter, M. G. (2003). Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. **Molecular Cell**, 11(2), 543–9.
- Dong, Z.L1., Wang, Y1., Li, T.F1., Zheng, S.J1., Kong, Y.Q1., Lan, Y.L1., Guo, J.L2., Fu, S.G3. (2014). p42/p44 mitogen-activated protein kinases inhibit atrial natriuretic peptide mRNA transcription in gp130-mediated hypertrophic ventricular myocytes. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. ;7(3):216-20. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60024-9.
- Dub, A.M., Dugani, A.M. (2013). Antithrombotic effect of repeated doses of the ethanolic extract of local olive (*Olea europaea* L.)leaves in rabbits. **Libyan Journal Medicine**. 22;8:20947. doi: 10.3402/ljm.v8i0.20947.
- Du, Y1., Guo, H., Lou, H. (2003). Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 24;310(3):979-85.
- Ergin, V., Hariry, R.E., Karasu, C.(2013). Carbonyl stress in aging process: role of vitamins and phytochemicals as redox regulators.**Aging Disease**. 1;4(5):276-94.
- Fahmi, A1., Smart, N., Pun, A., Jabr, R., Marber, M., Heads, R. (2013). p42/p44-MAPK and PI3K are sufficient for IL-6 family cytokines/gp130 to signal to hypertrophy and survival in cardiomyocytes in the absence of JAK/STAT activation. **Cellular Signalling**. 25(4):898-909. doi: 10.1016/
- Fares, R., Bazzi, S., Baydoun, S.E. (2011). Abdel-Massih RM. The antioxidant and anti-proliferative activity of the Lebanese *Olea europaea* extract. **Plant Foods for Human Nutrition**. ;66(1):58-63

- Fenton, H.J.H. (2003).On a new reaction of tartaric acid. *Chemical Degradation Methods for Wastes and Pollutants*. 1876: 33; 190.
- Ferrandi, C., Ballerio, R., Gaillard, P., Giachetti, C., Carboni, S., Vitte, P.A., Gotteland, J.P., Cirillo, R. (2004). Inhibition of c-Jun N-terminal kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and infarct size after myocardial ischemia and reperfusion in anaesthetized rats. ***British Journal of Pharmacology***. 142:953-960.
- Ferrando, B., Olaso-Gonzalez, G., Sebastia, V., Viosca, E., Gomez-Cabrera, M.C., Viña, J.(2014). [Allopurinol and its role in the treatment of sarcopenia.] *Revista Española de Geriatría y Gerontología*.14.pii:S0211-139X(14)00090-0.doi: 0.1016/j.regg.2014.05.001
- Fistonić, I., Situm, M., Bulat, V., Harapin, M., Fistonić, N., Verbanac, D. (2012). Olive oil biophenols and women's health. ***Medicinski glasnik (Zenica)***.;9(1):1
- Georgiev, V., Ananga, A., Tsoleva, V. (2014). Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. ***Nutrients***. 21;6(1):391-415.
- Giardina, C1., Inan, M.S. (1998). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, short-chain fatty acids, and reactive oxygen metabolism in human colorectal cancer cells. ***Biochimimica et Biophysica Acta***. 5;1401(3):277-88.
- Giovannini, C1., Masella, R. (2012). Role of polyphenols in cell death control. ***Nutritional Neuroscience***. 15(3):134-49. doi: 10.1179/1476830512Y.0000000006.
- Gong, J.S., Yao, Y.T., Fang, N.X., Huang, J., Li, L.H. (2012). Sevoflurane postconditioning alleviates action potential duration shortening and L-type calcium current suppression induced by ischemia/reperfusion injury in rat epicardial myocytes. ***Chinese Medical Journal (English)***. 125(19):3485-91
- Gordish, K.L., Beierwaltes, W.H.(2014). Resveratrol induces acute endothelium-dependent renal vasodilation mediated through nitric oxide and reactive oxygen species scavenging. ***American Journal of Physiology - Renal Physiology***. 1;306(5):F542-50.
- Gökgöz, L., Soncul, H., Sinci, V., Karasu, C., Kaptanoglu, M., Yener, A., Ersöz, A. (1992). Dipyridamole induced myocardial recovery after global ischemia. ***General Pharmacology***. 23(3):435-7.
- Gutteridge, J.M., Halliwell, B. (2000).Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. ***Annals of the New York Academy of Sciences***.899:136-47.
- Guz, G1., Oz, E., Lortlar, N., Ulusu, N.N., Nurlu, N., Demirogullari, B., Omeroglu, S., Sert, S., Karasu, C. (2007). The effect of taurine on renal ischemia/reperfusion injury. ***Amino Acids***. 32(3):405-11.
- Güneş, A., Ceylan, A., Sarioglu, Y., Stefek, M., Bauer, V., Karasu, C.(2005). Antioxidants in Diabetes-induced Complications (ADIC) Study Group. Reactive oxygen species mediate abnormal contractile response to sympathetic nerve stimulation and noradrenaline in the vas deferens of chronically diabetic rats: effects of in vivo treatment with antioxidants. ***Fundamental Clinical Pharmacology***. 19(1):73-9.

- Haber, F., Weiss, J. (1932).Über die katalyse des hydroperoxydes. *Naturwiss.* 51: 948-950.
- Halliwell, B.(2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*. 141(2):312-22.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., (1984). Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease. *Biochemical Journal*, **219**, 1-14.
- Hande, Gursoy-Haksevenler B. and Arslan-Alaton, I.(2014).Treatment of olive mill wastewater by chemical processes: effect of acid cracking pretreatment. *Water Science Technology*.69(7):1453-61
- Harding, S.V., Rideout, T.C., Jones, P.J. (2012). Evidence for using alpha-lipoic acid in reducing lipoprotein and inflammatory related atherosclerotic risk. *Journal of Dietary Supplements*. 9(2):116-27.
- Harman, D. (2006). Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1067:10-21.
- Hastings, C.L., Roche, E.T., Ruiz-Hernandez, E., Schenke-Layland, K., Walsh, C.J., Duffy, G.P. (2014). Drug and cell delivery for cardiac regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 27. pii: S0169-409X(14)00180-X. doi: 10.1016/
- Torula, H., Küçükboyacı, N., Tamera, U., Erginc, V., Elmazoğlu, Z., Karasu, Ç. (2015). Different extract samples from *Olea europaea* leaves and their phenolic compositions: Comparative evaluation on endothelial protecting activity against hydrogen peroxide-induced toxicity in vitro. *Natural Product Research*. In Press.
- Hingtgen, S.D., Tian, X., Yang, J., Dunlay, S.M., Peek, A.S., Wu, Y., Sharma, R. V.,Engelhardt, J.F., Davisson, R.L. (2006). Nox2-containing NADPH oxidase and Akt activation play a key role in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Physiological Genomics*. 26:180–191;
- Hirase, T., Node, K. (2012). Endothelial dysfunction as a cellular mechanism for vascular failure. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 1;302(3):H499-505.
- Hulsmans, M., Van Dooren, E., Holvoet, P. (2012). Mitochondrial reactive oxygen species and risk of atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*. 14(3):264-76
- Hünkar, T., Aktan, F., Ceylan, A., Karasu, C.(2002). Antioxidants in Diabetes-Induced Complications (ADIC) Study Group. Effects of cod liver oil on tissue antioxidant pathways in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Cell Biochemistry Function*. 20(4):297-302.
- Isfort, M., Stevens, S.C., Schaffer, S., Jong, C.J., Wold, L.E. (2014). Metabolic dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Heart Failure Reviews*. 19(1):35-48.
- Janjic, D., Wollheim, C.B. (1992). Islet cell metabolism is reflected by the MTT (tetrazolium) colorimetric assay. *Diabetologia*. 35(5):482-5.

- İnternet: Atina'da basılan Tetrardra bir zeytin ağacı ile dekore Attika kask ile Athena, zeytin dalı ve baykuşURL:<http://www.sabor-artesano.com/gb/olive-tree-mythology.htm>. Son Erişim Tarihi: 12.02.2015
- Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I.El., Feki, A., Sayadi, S. (2008). Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. **Chemico-Biological Interactions**. 25;176(2-3):88-98.
- Kang, S.M1., Lim, S., Song, H., Chang, W., Lee, S., Bae, S.M., Chung, J.H., Lee, H., Kim, H.G., Yoon, D.H., Kim, T.W., Jang, Y., Sung, J.M., Chung, N.S., Hwang, K.C. (2006). Allopurinol modulates reactive oxygen species generation and Ca²⁺ overload in ischemia-reperfused heart and hypoxia-reoxygenated cardiomyocytes. **European Journal of Pharmacology**. 27;535(1-3):212-9.
- Karahalil, B1., Kesimci, E., Emerce, E., Gumus, T., Kanbak, O. (2011). The impact of OGG1, MTH1 and MnSOD gene polymorphisms on 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and cellular superoxide dismutase activity in myocardial ischemia-reperfusion. **Molecular Biology Reports**. 38(4):2427-35. doi: 10.1007/s11033-010-0378-6.
- Karasu, C. (2010). Glycoxidative stress and cardiovascular complications in experimentally-induced diabetes: effects of antioxidant treatment. **The Open Cardiovascular Medicine Journal**. 26;4:240-56.
- Karasu, C. (1998). Acute probucol treatment partially restores vasomotor activity and abnormal lipid metabolism whereas morphological changes are not affected in aorta from long-term STZ-diabetic rats. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**. 106(3):189-96.
- Karasu, C., Ozansoy, G., Bozkurt, O., Erdoğan, D., Omeroğlu, S.(1997). Changes in isoprenaline-induced endothelium-dependent and -independent relaxations of aorta in long-term STZ-diabetic rats: reversal effect of dietary vitamin E. **General Pharmacology**. 29(4):561-7.
- Karasu, C., Ozansoy, G., Bozkurt, O., Erdoğan, D., Omeroğlu, S.(1997). Antioxidant and triglyceride-lowering effects of vitamin E associated with the prevention of abnormalities in the reactivity and morphology of aorta from streptozotocin-diabetic rats. Antioxidants in Diabetes-Induced Complications (ADIC) Study Group. **Metabolism**. 46(8):872-9.
- Karasu, C., Dewhurst, M., Stevens., E.J., Tomlinson, D.R.(1995). Effects of anti-oxidant treatment on sciatic nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats; comparison with essential fatty acids. **Diabetologia**. 38(2):129-34.
- Karasu, C., Cumaoğlu, A., Gürpınar, A.R., Kartal, M., Kovacicova, L., Milackova, I., Stefek, M. (2012). Aldose reductase inhibitory activity and antioxidant capacity of pomegranate extracts. **Interdiscip Toxicol**. 5(1):15-20
- Karasu, C. (2000). Time course of changes in endothelium-dependent and -independent relaxation of chronically diabetic aorta: role of reactive oxygen species. **European Journal of Pharmacology**. 31;392(3):163-73.

- Karasu, C.(1999). Increased activity of H₂O₂ in aorta isolated from chronically streptozotocin-diabetic rats: effects of antioxidant enzymes and enzymes inhibitors. **Free Radical Biology & Medicine**. 27(1-2):16-27.
- Kawai, Y.(2011). Immunochemical detection of food-derived polyphenols in the aorta: macrophages as a major target underlying the anti-atherosclerotic activity of polyphenols. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 75(4):609-17.
- Kawashima, S., Yokoyama, M.(2004). Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. **Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology**. 24(6):998-1005.
- Keleş, İ. (2002). Serbest oksijen radikalleri ve kardiyovasküler sistem. **İ.Ü. Kardiyoloji Enstitüsü Dergisi**. 2:38-43.
- Khan, N., Khymenets, O., Urpí-Sardà, M., Tulipani, S., Garcia-Aloy, M., Monagas, M., Mora-Cubillos, X., Llorach, R., Andres-Lacueva, C.(2014). Cocoa polyphenols and inflammatory mediators of cardiovascular disease. **Nutrients**. 21;6(2):844-80.
- Kim, G.H., Ryan, J.J., Archer, S.L. (2013). The role of redox signaling in epigenetics and cardiovascular disease. **Antioxidants & Redox Signaling**. 20;18(15):1920-36.
- Kim, M.S., Hur, H.J., Kwon, D.Y., Hwang, J.T. (2012). Tangeretin stimulates glucose uptake via regulation of AMPK signaling pathways in C2C12 myotubes and improves glucose tolerance in high-fat diet-induced obese mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 6;358(1):127-34.
- Kishimoto, Y1., Tani, M., Kondo, K.(2013). Pleiotropic preventive effects of dietary polyphenols in cardiovascular diseases. **European Journal Clinical Nutrition**. 67(5):532-5. doi: 10.1038/ejcn.2013.29.
- Kleniewska, P., Piechota, A., Skibska, B., Gorąca, A.(2012). The NADPH oxidase family and its inhibitors. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)**. 60(4):277-94.
- Kontogianni, V.G., and Gerothanassis, I.P. (2012). Phenolic compounds and antioxidant activity of olive leaf extracts. **Natural Product Research**, 26, 186-189.
- Koçak, G. and Karasu, C. (2002). Elimination of *O(2)(-)/H(2)O(2) by alpha-lipoic acid mediates the recovery of basal EDRF/NO availability and the reversal of superoxide dismutase-induced relaxation in diabetic rat aorta. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. 4(1):69-74.
- Koçak, G., Aktan, F., Canbolat, O., Ozoğul, C., Elbeğ, S., Yildizoglu-Ari, N., Karasu, C. (2000). ADIC Study Group--Antioxidants in Diabetes-Induced Complications. Alpha-lipoic acid treatment ameliorates metabolic parameters, blood pressure, vascular reactivity and morphology of vessels already damaged by streptozotocin-diabetes. **Diabetes Nutrition & Metabolism**. 13(6):308-18.
- Krausz, A., Gunn, H., Friedman, A.(2014). The basic science of natural ingredients. **Journal Drugs Dermatology**. 13(8):937-43; quiz 944-5.

- Kulkarni, R., Acharya, J., Ghaskadbi, S., Goel, P. (2014). Oxidative stress as a covariate of recovery in diabetes therapy. **Front Endocrinology (Lausanne)**. 12;5:89.
- Kumar, S. and Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **ScientificWorld Journal**. 29;2013:162750.
- Korashy, H.M1., Al-Suwayeh, H.A., Maayah, Z.H., Ansari, M.A., Ahmad, S.F., Bakheet, S.A. (2014). Mitogen-Activated Protein Kinases Pathways Mediate the Sunitinib-Induced Hypertrophy in Rat CardiomyocyteH9c2 **Cellular Cardiovascular Toxicology**. 2. [Epub ahead of print]
- Koçak, G. and Karasu, C. (2002). Elimination of $\cdot\text{O}_2(-)/\text{H}_2\text{O}_2$ by alpha-lipoic acid mediates the recovery of basal EDRF/NO availability and the reversal of superoxide dismutase-induced relaxation in diabetic rat aorta. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. 4(1):69-74.
- Koçak, G., Aktan, F., Canbolat, O., Ozoğul, C., Elbeğ, S., Yildizoglu-Ari, N., Karasu, C. (2000). Alpha-lipoic acid treatment ameliorates metabolic parameters, blood pressure, vascular reactivity and morphology of vessels already damaged by streptozotocin-diabetes. ADIC Study Group--Antioxidants in Diabetes-Induced Complications. **Diabetes Nutrition& Metabolism**. 13(6):308-18.
- Kukongviriyapan, U., Pannangpetch, P., Kukongviriyapan, V., Donpunha, W., Sompamit, K., Surawattanawan, P. (2014). Curcumin protects against cadmium-induced vascular dysfunction, hypertension and tissue cadmium accumulation in mice. **Nutrients**. 21;6(3):1194-208.
- Kyselova, Z., Gajdosik, A., Gajdosikova, A., Ulicna, O., Mihalova, D., Karasu, C., Stefek, M. (2005). Effect of the pyridoinole antioxidant stobadine on development of experimental diabetic cataract and on lens protein oxidation in rats: comparison with vitamin E and BHT. **Molecular Vision**. 19;11:56-65.
- Kwak, H.B. (2013). Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. **Journal of Exercise Rehabilitation**. 9:212-219.
- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden, Bergle, T., and Vandenabeele, P. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. **Cell Death and Differentiation**, 14, 44-55.
- Lee, J.H., Regmi, S.C., Kim, J.A., Cho, M.H., Yun, H., Lee, C.S., Lee, J. (2011). Apple flavonoid phloretin inhibits Escherichia coli O157:H7 biofilm formation and ameliorates colon inflammation in rats. **Infection Immunity**. 79(12):4819-27.
- Lee, Y.S., Cha, B.Y., Choi, S.S., Choi, B.K., Yonezawa, T., Teruya, T., Nagai, K., Woo, J.T. (2013). Nobiletin improves obesity and insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. 24(1):156-62.

- Lemke, L.E1., Bloem, L.J., Fouts, R., Esterman, M., Sandusky, G., Vlahos, C.J.(2001). Decreased p38 MAPK activity in end-stage failing human myocardium: p38 MAPK alpha is the predominant isoform expressed in human heart. ***Journal of Molecular and Cellular Cardiology***. 33(8):1527-40.
- Lemmens, K.J., van de Wier, B., Vaes, N., Ghosh, M., van Zandvoort, M.A., van der Vijgh, W.J., Bast, A., Haenen, G.R.(2014). The flavonoid 7-mono-O-(β -hydroxyethyl)-rutoside is able to protect endothelial cells by a direct antioxidant effect. ***Toxicology In Vitro***. 28(4):538-43.
- Leong, D.J., Choudhury, M., Hirsh, D.M., Hardin, J.A., Cobelli, N.J., Sun, H.B.(2013). Nutraceuticals: potential for chondroprotection and molecular targeting of osteoarthritis. ***International Journal of Molecular Sciences***. 21;14(11):23063-85
- Li, H., Horke, S., Förstermann, U.(2014). Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. ***Atherosclerosis***. 9;237(1):208-219.
- Liu, C.C., Fry, N.A., Hamilton, E.J., Chia, K.K., Garcia, A., Karimi Galougahi, K., Figtree, G.A., Clark, R.J., Bundgaard, H., Rasmussen, H.H.(2013). Redox-dependent regulation of the Na⁺-K⁺ pump: new twists to an old target for treatment of heartfailure. ***Journal of Molecular and Cellular Cardiology***. 61:94-101.
- Liu, W1., Xu, Z., Yang, T., Deng, Y., Xu, B., Feng, S., Li, Y.(2014). The protective role of tea polyphenols against methylmercury-induced neurotoxic effects in rat cerebral cortex via inhibition of oxidative stress. ***Free Radical Research***. 48(8):849-63. doi: 10.3109/10715762.2014.916039.
- Lochner, A., Marais, E., Genade, S., Huisamen, B., du Toit, E.F., Moolman, J.A.(2009). Protection of the ischaemic heart: investigations into the phenomenon of ischaemic preconditioning. ***Cardiovascular Journal African***. 20(1):43-51.
- Looi, Y. H., Grieve, D. J., Siva, A., Walker, S. J., Anilkumar, N., Cave, A. C., Marber, M., Monaghan, M. J., Shah, A. M.(2008). Involvement of Nox2 NADPH oxidase in adverse cardiac remodeling after myocardial infarction. ***Hypertension***. 51:319–325;
- Magrone, T., Perez de Heredia, F., Jirillo, E., Morabito, G., Marcos, A., Serafini, M.(2013). Functional foods and nutraceuticals as therapeutic tools for the treatment of diet-related diseases. ***Can Journal Physiology Pharmacology***. 91(6):387-96.
- Malar, D.S. and Devi, K.P. (2014).Dietary polyphenols for treatment of Alzheimer's disease-future research and development. ***Current Pharmaceutical Biotechnology***.15(4):330-42.
- Mao, B1., Gao, Y1., Bai, Y2., Yuan, Z3.(2014). Hippo signaling in stress response and homeostasis maintenance. ***Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)***. 4. pii: gmu109. [Epub ahead of print]
- Mao, P. and Reddy, P.H.(2011). Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: implications for early intervention and therapeutics. ***Acta Biochimica et Biophysica Sinic***. 1812(11):1359-70.

- Mapanga, R.F., Tufts, M.A., Shode, F.O., Musabayane, C.T.(2009). Renal effects of plant-derived oleanolic acid in streptozotocin-induced diabetic rats. **Ren Failura**.31(6):481-91.
- Marino, S.D., Festa, C., Zollo, F., Nini, A., Antenucci, L., Raimo, G., Iorizzi, M1.(2014). Antioxidant Activity and Chemical Components as Potential Anticancer Agents in the Olive Leaf (*Olea europaea* L. cv Leccino.) Decoction. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**. 14(10):1376-85.
- Martyn, K.D., Frederick, L.M., von Loehneysen, K., Dinauer, M.C., Knaus, U.G. (2006). Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. **Cell Signaling**. 18:69–82;
- Matesanz, N1., Lafuente, N., Azcutia, V., Martín, D., Cuadrado, A., Nevado, J., Rodríguez-Mañas, L., Sánchez-Ferrer, C.F., Peiró, C.(2007). Xanthine oxidase-derived extracellular superoxide anions stimulate activator protein 1 activity and hypertrophy in human vascular smooth muscle via c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. **Journal of Hypertension**. 25(3):609-18.
- McNeilly, A.M., Davison, G.W., Murphy, M.H., Nadeem, N., Trinick, T., Duly, E., Novials, A., McEneny, J.(2011). Effect of α -lipoic acid and exercise training on cardiovascular disease risk in obesity with impaired glucose tolerance. **Lipids Health Disease**. 22;10:217.
- Miao, Y., Zhou, J., Zhao, M., Liu, J., Sun, L., Yu, X., He, X., Pan, X., Zang, W. (2013). Acetylcholine attenuates hypoxia/ reoxygenation-induced mitochondrial and cytosolic ROS formation in H9c2 cells via M2 acetylcholine receptor. **Cellular Physiology Biochemistry**. 31:189-198.
- Miller, S.L., Wallace, E.M., Walker, D.W.(2012). Antioxidant therapies: a potential role in perinatal medicine. **Neuroendocrinology**. 96(1):13-23.
- Milackova, I., Kovacikova, L., Veverka, M., Gallovic, J., Stefek, M.(2013). Screening for antiradical efficiency of 21 semi-synthetic derivatives of quercetin in a DPPH assay. **Interdiscip Toxicology**. 6(1):13-7. doi: 10.2478/intox-2013-0003.
- Minamino, T.(2010). Role of cellular senescence in lifestyle-related disease. **Circulation Journal**. 74(12):2527-33.
- Mocchegiani, E., Costarelli, L., Giacconi, R., Malavolta, M., Basso, A., Piacenza, F., Ostan, R., Cevenini, E., Gonos, E.S., Monti, D. (2014). Micronutrient-gene interactions related to inflammatory/immune response and antioxidant activity in ageing and inflammation. A systematic review. **Mechanisms of Ageing and Development**. 136-137:29-49.
- Mohagheghi F, Bigdeli MR, Rasoulia B, Hashemi P, Pour MR. The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood-brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia. **Phytomedicine**. 2011 Jan 15;18(2-3):170-5. doi:

- Mukherjee, S., Ghosh, S., Choudhury, S., Adhikary, A., Manna, K., Dey, S., Sa, G., Das, T., Chattopadhyay, S. (2013). Pomegranate reverses methotrexate-induced oxidative stress and apoptosis in hepatocytes by modulating Nrf2-NF- κ B pathways. ***Journal Nutrition Biochemistry***. 24(12):2040-50.
- Naczki, M. and Shahidi, F.(2007). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***. 17;43(2):798.
- Nadruz, W.(2015). Myocardial remodeling in hypertension. ***Journal Human Hypertension***. 29(1):1-6.
- Nagai, N., Klimava, A., Lee, W.H., Izumi-Nagai, K., Handa, J.T.(2009). CTGF is increased in basal deposits and regulates matrix production through the ERK (p42/p44mapk) MAPK and the p38 MAPK signaling pathways. ***Investigative Ophthalmology & Visual Science***. 50: 1903-1910.
- Najafian, M., Jahromi, M.Z., Nowrooznejhad, M.J., Khajeaian, P., Kargar, M.M., Sadeghi, M., Arasteh, A. (2012). Phloridzin reduces blood glucose levels and improves lipids metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. ***Molecular Biology Reports***. 39(5):5299-306. doi:
- Nasiri-Toosi, Z., Dashti-Khavidaki, S., Khalili, H., Lessan-Pezeshki, M.(2013). A review of the potential protective effects of pentoxifylline against drug-induced nephrotoxicity. ***European Journal of Clinical Pharmacology***. 69(5):1057-73.
- Nazarewicz, R.R., Dikalova, A.E., Bikineyeva, A., Dikalov, S.I.(2013). Nox2 as a potential target of mitochondrial superoxide and its role in endothelial oxidative stress. ***American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology***. 15;305(8):H1131-40
- Negre-Salvayre, A., Coatrieux, C., Ingueneau, C., Salvayre, R. (2008). Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. ***British Journal of Pharmacology***. 153: 6-20.
- Nelson, S.K., Gao, B., Bose, S., Rizeq, M., McCord, J.M.(2002). A novel heparin-binding, human chimeric, superoxide dismutase improves myocardial preservation and protects from ischemia-reperfusion injury. ***The Journal of Heart and Lung Transplantation***. 21(12):1296-303.
- Nessar, A.(2005). Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. ***Diabetes Research Clinical Practice***. 67: 3–21.
- Nordberg, J. and Arnér, E.S.J., (2001). Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. ***Free Radical Biology Medicine***. 31, 1287–1312.
- Nowak, J.Z. (2013). Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids-derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on age-related macular degeneration. ***Pharmacology Report***. 65(2):288-304.

- Nuhu, A.A. (2014). Bioactive micronutrients in coffee: recent analytical approaches for characterization and quantification. *ISRN Nutrition*. 22;2014:384230.
- Onderoglu, S., Sozer, S., Erbil, K.M., Ortac, R., Lermioglu, F. (1999). The evaluation of long-term effects of cinnamon bdiğerleri and olive leaf on toxicity induced by streptozotocin administration to rats. *Journal of Pharmcy Pharmacology*. 51(11):1305-12.
- Otani, H. (2013). Site-specific antioxidative therapy for prevention of atherosclerosis and cardiovascular disease. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*. 2013;2013:936436.
- Pagliaro, P. and Penna, C. (2014). Redox signaling and cardioprotection - translatability and mechanism. *British Journal of Pharmacology*. 10. doi: 10.1111/bph.12975.
- Paiva-Martins, F. and Gordon, M. H. (2001). Isolation and characterization of the antioxidant component 3,4-dihydroxyphenylethyl 4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from Olive (*Olea europaea*) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 4214-4219.
- Parhiz, H., Roohbakhsh, A., Soltani, F., Rezaee, R., Iranshahi, M. (2014). Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. *Phytotherapy Research*. 13. doi: 10.1002/ptr.5256.
- Poudyal, H., Campbell, F., Brown, L. (2010). Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *Journal of Nutrition*. 140(5):946-53. Doi
- Pekiner, B., Ulusu, N.N., Das-Evcimen, N., Sahilli, M., Aktan, F., Stefek, M., Stolc, S., Karasu, C., (2002). In vivo treatment with stobadine prevents lipid peroxidation, protein glycation and calcium overload but does not ameliorate Ca²⁺ -ATPase activity in heart and liver of streptozotocin-diabetic rats: comparison with vitamin E. Antioxidants in Diabetes-Induced Complications Study Group. *Biochimica Biophysica Acta*. 9;1588(1):71-8.
- Pimentel, D. R., Adachi, T., Ido, Y., Heibeck, T., Jiang, B., Lee, Y., Melendez, J. A., Cohen, R.A., Colucci, W.S. (2006). Strain-stimulated hypertrophy in cardiac myocytes is mediated by reactive oxygen species-dependent Ras S-glutathiolation. *Journal of Molecular Cellular Cardiology*. 41:613–622;
- Piotrowska, A. and Bartnik, E. (2014). [The role of reactive oxygen species and mitochondria in aging]. *Postepy Biochemii*. 60(2):240-7.
- Prathapan, A1., Vineetha, V.P., Abhilash, P.A., Raghu, K.G. (2007). Boerhaavia diffusa L. attenuates angiotensin II-induced hypertrophy in H9c2 cardiac myoblast cells via modulating oxidative stress and down-regulating NF-κβ and transforming growth factor β1. *Food Chemistry*. 7;55(5):1695-701.
- Resende, F.A., da Silva Almeida, C.P., Vilegas, W., Varanda, E.A. (2014). Differences in the hydroxylation pattern of flavonoids alter their chemoprotective effect against direct- and indirect-acting mutagens. *Food Chemistry*. 15;155:251-5. doi:

- Reed, J.C., Doctor, K.S., Godzik, A. (2004). The domains of apoptosis: a genomics perspective. **Science STKE**. 22;2004(239):re9. Review.
- Risbano, M.G. and Gladwin, M.T. (2013). Therapeutics targeting of dysregulated redox equilibrium and endothelial dysfunction. **Handbook Experimental Pharmacology**. 218:315-49. doi: 10.1007/978-3-642-38664-0_13.
- Rodier, F1. and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. **Journal of Cellular Biology**. 21;192(4):547-56.
- Rochette, L., Lorin, J., Zeller, M., Guillard, J.C., Lorgis, L., Cottin, Y., Vergely, C. (2013). Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? **Pharmacology Therapeutics**. 140(3):239-57.
- Rochette, L1., Zeller, M2., Cottin, Y2., Vergely, C2. (2014). Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. **Biochimica of Biophysica Acta**. 1840(9):2709-29. doi: 10.1016
- Rodrigo, R., Libuy, M., Feliu, F., Hasson, D. (2014). Polyphenols in disease: from diet to supplements. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. 15(4):304-17.
- Ryan, D., Prenzler, P.D., Lavee, S., Antolovich, M., Robards, K. (2003). Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 2532-2538.
- Ryter, S.W. and Choi, A.M. (2013). Regulation of autophagy in oxygen-dependent cellular stress. **Current Pharmaceutical Design**. 19(15):2747-56.
- Sacco, E., Spinelli, M., and Vanoni, M. (2012). Approaches to Ras signaling modulation and treatment of Ras-dependent disorders: a patent review (2007--present). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, 22(11), 1263-87.
- Saha, S.S. and Ghosh, M. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory effect of conjugated linolenic acid isomers against streptozotocin-induced diabetes. **British Journal of Nutrition**. 28;108(6):974-83
- Sanchis-Gomar, F., Pareja-Galeano, H., Gomez-Cabrera, M.C., Candel, J., Lippi, G., Salvagno, G.L., Mann, G.E., Viña, J. (2014). Allopurinol prevents cardiac and skeletal muscle damage in professional soccer players. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**. 1. doi: 10.1111/sms.12213. [Epub ahead of print]
- Sanchis-Gomar, F., Pareja-Galeano, H., Perez-Quilis, C., Santos-Lozano, A., Fiuza-Luces, C., Garatachea, N., Lippi, G., Lucia, A. (2014). Effects of allopurinol on exercise-induced muscle damage: new therapeutic approaches? **Cellular Stress Chaperones**. 3. [Epub ahead of print]
- Santhakumar, A.B., Bulmer, A.C., Singh, I. (2014). A review of the mechanisms and effectiveness of dietary polyphenols in reducing oxidative stress and thrombotic risk. **Journal Human Nutrition Diet**. 27(1):1-21. Doi

- Santilli, F., Guagnano, M.T., Vazzana, N., Barba, S.L., Davì, G1. (2014). Oxidative Stress Drivers And Modulators In Obesity And Cardiovascular Disease: From Biomdigerleriers To Therapeutic Approach. **Current Medicinal Chemistry**. 28. [Epub ahead of print]
- Santos, C.X1., Anilkumar, N., Zhang, M., Brewer, A.C., Shah, A.M. (2011). Redox signaling in cardiac myocytes. **Free Radical Biology & Medicin**. 1;50(7):777-93. doi: 10.1016/j.e.2011.01.003.
- Sarath, T.S., Waghe, P., Gupta, P., Choudhury, S., Kannan, K., Pillai, A.H., Harikumar, S.K., Mishra, S.K., Sarkiar S.N.(2014).Atorvastatin ameliorates arsenic-induced hypertension and enhancement of vascular redox signaling in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology** .11.pii:S0041-008X(14)00324-X.doi: 10.1016/j.taap.2014.08.032. [Epub ahead of print]
- Scharf, M., Neef, S., Freund, R., Geers-Knörr, C., Franz-Wachtel, M., Brandis, A., Krone, D., Schneider, H., Groos, S., Menon, M.B., Chang, K.C. (2013). Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinases 2 and 3 regulate SERCA2a expression and fiber type composition to modulate skeletal muscle and cardiomyocyte function. **Molecular and Cellular Biology**. 33:2586-602.
- Scheffler, A., Rauwald, H.W., Kampa, B., Mann, U., Mohr, F.W., Dhein, S.(2008). Olea europaea leaf extract exerts L-type Ca(2+) channel antagonistic effects. **Journal of Ethnopharmacol**. 20;120(2):233-40.
- Schulz, E., Gori, T., Münzel, T. (2011). Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. **Hypertension Research**. 34(6):665-73.
- Sestili, P., Martinelli, C., Ricci, D., Fraternali, D., Bucchini, A., Giamperi, L., Curcio, R., Piccoli, G., Stocchi, V. (2007). Cytoprotective effect of preparations from various parts of Punica granatum L. fruits in oxidatively injured mammalian cells in comparison with their antioxidant capacity in cell free systems. **Pharmacology Research**. 56(1):18-26
- Shema-Didi, L., Kristal, B., Sela, S., Geron, R., Ore, L. (2014). Does Pomegranate intake attenuate cardiovascular risk factors in hemodialysis patients? **Nutrition Journal**. 4;13:18. doi: 10.1186/1475-2891-13-18.
- Siasos, G., Tousoulis, D., Tsigkou, V., Kokkou, E., Oikonomou, E., Vavuranakis, M., Basdra, E.K., Papavassiliou, A.G., Stefanadis, C. (2013). Flavonoids in atherosclerosis: an overview of their mechanisms of action. **Current Medicinal Chemistry**.20(21):2641-60.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphormolybdc phosphotungstic acid reagents. **American Society for Enology and Viticulture**, 16, 144-58.
- Skalska, S., Kyselova, Z., Gajdosikova, A., Karasu, C., Stefek, M., Stolc, S. (2008). Protective effect of stobadine on NCV in streptozotocin-diabetic rats: augmentation by vitamin E. **General Physiology Biophysics**. 27(2):106-14

- Skinner, M.A., Bentley-Hewitt, K., Rosendale, D., Naoko, S., Pernthaner, A. (2013). Effects of kiwifruit on innate and adaptive immunity and symptoms of upper respiratory tract infections. ***Advances Food and Nutrition Research***. 68:301-20.
- Soncul, H., Ersöz, A., Gökgöz, L., Karasu, C., Ayrancıoğlu, K., Sinci, V., Altan, M.(1992). Cardioplegia with adenosine and adenosine triphosphate in the isolated guinea pig heart. ***Japanese Heart Journal***. 33(6):843-50.
- Soncul, H., Gökgöz, L., Karasu, C., Ayrancıoğlu, K., Ersöz, A., Altan, M., Yener, A.(1992). Comparison of potassium and adenosine cardioplegia with or without verapamil in the isolated guinea pig heart. ***General Pharmacology***. 23(1):89-93.
- Sozen, E., Karademir, B., Ozer, N.K. (2014). Basic mechanisms in endoplasmic reticulum stress and relation to cardiovascular diseases. ***Free Radical Biology and Medicine***. 22;78C:30-41.
- Stamp, L.K1. and Chapman, P.T. (2014). Urate-lowering therapy: current options and future prospects for elderly patients with gout. ***Drugs & Aging***. 31(11):777-86. doi: 10.1007/s40266-014-0214-0.
- Stangl, V., Dreger, H., Stangl, K., Lorenz, M. (2007). Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. ***Cardiovascular Research***. 15;73(2):348-58.
- Stefek, M. and Karasu, C. (2011). Eye lens in aging and diabetes: effect of quercetin. ***Rejuvenation Research***. 14(5):525-34.
- Streicher, J.M1., Ren, S., Herschman, H., Wang, Y. (2010).Cell Commun Signal. MAPK-activated protein kinase-2 in cardiac hypertrophy and cyclooxygenase-2 regulation in heart. ***Circulation Research***. 30;106(8):1434-43.
- Sudano, I., Roas, S., Noll, G. (2011). Vascular abnormalities in essential hypertension. ***Current Pharmaceutical Desing***. 17(28):3039-44.
- Sugden, P. H. and Clerk, A. (2006).Oxidative stress and growth-regulating intracellular signaling pathways in cardiac myocytes. ***Antioxidants & Redox Signaling*** 8:2111–2124;
- Sureda, A., Tejada, S., Bibiloni Mdel, M., Tur, J.A., Pons, A. (2014). Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: polyphenol supplementation and exercise-induced oxidative stress and inflammation. ***Current Pharmaceutical Biotechnolog***. 15(4):373-9.
- Swift, L.M1. and Sarvazyan, N. (2000). Localization of dichlorofluorescein in cardiac myocytes: implications for assessment of oxidative stress. ***American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology***. 278(3):H982-90.
- Tanagornmeatar, K., Chaotham, C., Sritularak, B., Likhitwitayawuid, K., Chanvorachote, P. (2014). Cytotoxic and Anti-metastatic Activities of Phenolic Compounds from *Dendrobium ellipsophyllum*. ***Anticancer Research***. 34(11):6573-9.

- Tang, C.H., Wei, W., Liu, L. (2012). Regulation of DNA repair by S-nitrosylation. *Biochimica Biophysica Acta*. 1820(6):730-5.
- Tezcan, G., Tunca, B., Bekar, A., Budak, F., Sahin, S., Cecener, G., Egeli, U., Taskapılıoglu, M.O., Kocaeli, H., Tolunay, S., Malyer, H., Demir, C., Tumen, G.(2014). Olea europaea leaf extract improves the treatment response of GBM stem cells by modulating miRNA expression. *American Journal of Cancer Research*. 6;4(5):572-90.
- Theodora-Ioanna, L1.,Andriana, E.L2.,Vasillia, J. S1. and Evangelos, S.L1. (2013) .Phenolic extracts from wild olive leaves and their potential as edible oils antioxidants. *Foods*,2,18-31;doi:10.3390/*Foods*2010018
- Tullio, F., Angotti, C., Perrelli, M.G., Penna, C., Pagliaro, P. (2013). Redox balance and cardioprotection. *Basic Research in Cardiology*. 108(6):392.
- Uluslu, N.N., Sahilli, M., Avci, A., Canbolat, O., Ozansoy, G., Ari, N., Bali, M., Stefek, M., Stolc, S., Gajdosik, A., Karasu, C. (2003). Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E. *Neurochem Research*. 28(6):815-23.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology*. 39: 44–84.
- van Empel, V. P., Bertrand, A. T., Hofstra, L., Crijns, H. J., Doevendans, P. A., De Windt, L. J. (2005). Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovascular Research*. 67:21–29;
- van Rooy, M.J. and Pretorius, E. (2014). Obesity, hypertension and hypercholesterolemia as risk factors for atherosclerosis leading to ischemic events.*Current Medicinal Chemistry*. 21(19):2121-9.
- Villegas, L.R1., Kluck, D., Field, C., Oberley-Deegan, R.E., Woods, C., Yeager, M.E., El Kasmi, K.C., Savani, R.C., Bowler, R.P., Nozik-Grayck, E. (2013). Superoxide dismutase mimetic, MnTE-2-PyP, attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, pulmonary vascular remodeling, and activation of the NALP3 inflammasome. *Antioxidants & Redox Signaling*. 10;18(14):1753-64. doi: 10.1089/
- Viña, J., Borras, C., Abdelaziz, K.M., Garcia-Valles, R., Gomez-Cabrera, M.C. (2013). The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging. *Antioxidants & Redox Signaling*. 10;19(8):779-87.
- Vineetha, V.P1., Girija, S., Soumya, R.S., Raghu, K.G. (2013). Polyphenol-rich apple (*Malus domestica* L.) peel extract attenuates arsenic trioxide induced cardiotoxicity in H9c2 cells via its antioxidant activity. *The British Journal Nutrition*. 110(7):1201-10. doi: 10.1017/S0007114513000561.
- Violi, F1., Carnevale, R2., Pastori, D2., Pignatelli, P2. (2014). Antioxidant and antiplatelet effects of atorvastatin by Nox2 inhibition. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 24(4):142-8. doi: 10.1016/j.tcm.2013.09.006.

- Volkan, E1., Bali, E.B.2, 3., Hariry, R.E.2. and Karasu, Ç2. (2013). Natural products and the aging process. ***Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation***. 47-55.
- Wahyudi, S. and Sargowo, D. (2007). Green tea polyphenols inhibit oxidized LDL-induced NF-KB activation in human umbilical vein endothelial cells. ***Acta Medica Indonesiana***. 39(2):66-70.
- Walker, J.M., Klakotskaia, D., Ajit, D., Weisman, G.A., Wood, W.G., Sun, G.Y., Serfozo, P., Simonyi, A., Schachtman, T.R. (2014). Beneficial Effects of Dietary EGCG and Voluntary Exercise on Behavior in an Alzheimer's Disease Mouse Model. ***Journal of Alzheimers Disease***. 15.
- Wang, P., Phan, T., Gordon, D., Chung, S., Henning, S.M., Vadgama, J.V. (2014). Arctigenin in combination with quercetin synergistically enhances the anti-proliferative effect in prostate cancer cells. ***Molecular Nutrition Food Research***. 7.
- Wang, Y. (2007). cMitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. ***Circulation***. 116:1413-1423.
- Wang, Y.G., Li, Y., Wang, C.Y., Ai, J.W., Dong, X.Y., Huang, H.Y., Feng, Z.Y., Pan, Y.M., Lin, Y., Wang, B.X., Yao, L.L. (2014). L-3-n-Butylphthalide protects rats' cardiomyocytes from ischaemia/reperfusion-induced apoptosis by affecting the mitochondrial apoptosis pathway. ***Acta Physiologica*** (Oxford). 210(3):524-33
- Wang, X1., Yuan, B., Dong, W., Yang, B., Yang, Y., Lin, X., Gong, G. (2014). Humid heat exposure induced oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes through the angiotensin II signaling pathway. ***Heart Vessels***. 5. [Epub ahead of print]
- Widmer, R.J., Freund, M.A., Flammer, A.J., Sexton, J., Lennon, R., Romani, A., Mulinacci, N., Vinceri, F.F., Lerman, L.O., Lerman, A. (2013). Beneficial effects of polyphenol-rich olive oil in patients with early atherosclerosis. ***European Journal of Nutrition***. 52(3):1223-31. doi: 10.1007/s00394-012-0433-2
- Winterbourn, C.C. (2013). The biological chemistry of hydrogen peroxide. ***Methods Enzymology***. 528:3-25.
- Wong, R.H., Garg, M.L., Wood, L.G., Howe, PR. (2014). Antihypertensive potential of combined extracts of olive leaf, green coffee bean and beetroot: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. ***Nutrients***. 5;6(11):4881-94.
- Yang, Y., Sun, Y., Yi, W., Li, Y., Fan, C., Xin, Z., Jiang, S., Di, S., Qu, Y., Reiter, R.J., Yi, D. (2014). A review of melatonin as a suitable antioxidant against myocardial ischemia-reperfusion injury and clinical heart diseases. ***Journal of Pineal Research***. 17. doi: 10.1111/jpi.12175.
- Yannoutsos, A., Levy, B.I., Safar, M.E., Slama, G., Blacher, J. (2014). Pathophysiology of hypertension: interactions between macro and microvascular alterations through endothelial dysfunction. ***Journal of Hypertension***. 32(2):216-24.

- Yoshida, H1., Watanabe, W., Oomagari, H., Tsuruta, E., Shida, M., Kurokawa, M. (2013). Citrus flavonoid naringenin inhibits TLR2 expression in adipocytes. ***The Journal of Nutritional Biochemistry***. 24(7):1276-84. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.10.003.
- Yashiro, T., Nanmoku, M., Shimizu, M., Inoue, J., Sato, R.(2012). Resveratrol increases the expression and activity of the low density lipoprotein receptor in hepatocytes by the proteolytic activation of the sterol regulatory element-binding proteins. ***Atherosclerosis***. 220(2):369-74.
- Yülek, F., Or, M., Ozoğul, C., Isik, A.C., Ari, Nç, Stefek, M., Bauer, V. and Karasu C. (2007).Effects of stobadine and vitamin E in diabetes-induced retinal abnormalities: involvement of oxidative stress. ***Archives of Medical Research***. 38(5):503-11.
- Zhang, C., Liu, J., Pan, H., Yang, X. and Bian, K.(2011). Mitochondrial dysfunction induced by excessive ROS/RNS-metabolic cardiovascular disease and traditional ***Chinese Medicines Intervention***. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.36(17):2423-8.
- Zhang, W., Fu, F., Tie, R., Liang, X., Tian, F., Xing, W., Li, J., Ji, L., Xing, J., Sun, X. and Zhang, H.(2013). Alpha-linolenic acid intake prevents endothelial dysfunction in high-fat diet-fed streptozotocin rats and underlying mechanisms. ***Vasa***. 42(6):421-8
- Zobali, F., Besler, T., Ari, N., Karasu, C. (2002). Hydrogen peroxide-induced inhibition of vasomotor activity: evaluation of single and combined treatments with vitamin A and insulin in streptozotocin-diabetic rats. ***International Journal of Experimental Diabetes Research***. 3(2):119-30.
- Zobali, F., Avci, A., Canbolat, O., Karasu C.(2002). Effects of vitamin A and insulin on the antioxidative state of diabetic rat heart: a comparison study with combination treatment. ***Cell Biochemistry Function***. 20(2):75-80.
- Zobali, F., Cakici, I., Karasu, C.(2001). Effects of peroxynitrite on the reactivity of diabetic rat aorta. ***Pharmacology***. 63(1):58-64.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : ÖZBEK, Namık
 Uyruğu : T.C.
 Doğum Tarihi ve Yeri : 01.06.1962 / Eskişehir
 Medeni Hali : Evli
 Telefon numarası : 505 293 82 17
 e-posta : drnozbek@gmail.com



Eğitim Derecesi	Okul/ Programı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi/ Tıbbi Farmakoloji AD	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Türkiye Ortadoğu Amma İdaresi Enstitüsü/Kamu yönetimi	1998
Lisans	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi	1986

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2015	Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi	Doktor
2012	TKHK	Proje Koordinatörü
2009 - 2012	Proje Yönetim Destek Birimi	Koordinatör
2007 – 2009	Sağlık Bakanlığı İzleme Değerlendirme Birimi	Proje Direktörü
2004 - 2007	Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi	BaşhekimYard.
2004 – 2004	Sağlık Bakanlığı Temel Sağ. Hiz.Gen. Md.	Genel Md. Yard.
2000 – 2003	Sağlık Bakanlığı İlaç Eczacılık Genel Md.	Genel Md. Yard

1992 - 2000	SHÇEK Rehabilitasyon Merkezi	Tıp Doktorluğu
1989 - 1992	Nevşehir İl Sağlık Müdürlüğü	İl Müdür Vekili

Yabancı Dil

English (Intermediate)

Üyelikler

- Ankara Tabip Odası
- Klinik Araştırmalar Derneği
- Koruyucu, Yenileyici, Yaşlanma Karşıtı Tıp Derneği
- Türk Farmakoloji Derneği



GAZİ GELECEKTİR..