



EPIGALLOKATEŞİN GALLAT (EGCG)'İN NORMAL VE YÜKSEK GLUKOZ ORTAMINDA İZOLE SIÇAN KARDİYOMYOSİTLERİ ÜZERİNDEKİ DİREKT ETKİLERİ

*DIRECT EFFECTS OF EPIGALLOCATECHIN GALLATE (EGCG) ON ISOLATED RAT
CARDIOMYOCYTES UNDER NORMAL AND HIGH GLUCOSE CONCENTRATIONS*

Gizem KAYKI MUTLU*, Zeynep Elif YEŞİLYURT, Betül Rabia ERDOĞAN, İrem
KARAÖMERLİOĞLU, Ayhanım Elif MÜDERRİSOĞLU, Ebru ARIOĞLU İNAN,
Nuray ARI

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Kardiyovasküler komplikasyonlar diyabetik hastalarda en önde gelen morbidite ve mortalite nedenidir. Bu komplikasyonların patogenezi en önemli faktör hiperglisemidir. Öte yandan günlük diyetle tüketilen polifenolik maddelerin kalp hastalıklarına karşı koruyucu oldukları bilinmektedir. Polifenoller bakımından çok zengin olan çay tüketiminin kalp hastalığı riski ve kardiyovasküler mortaliteyi azalttığı bilinmektedir. Çayın içerdiği başlıca polifenolik madde epigallokateşin gallat (EGCG)'tır. EGCG'nin diyabet gibi çeşitli patolojilerde kardiyoprotektif etkili olduğu bildirilmiştir. Ne var ki, kalp üzerindeki direkt kardiyak etkileri bilinmemektedir. Bu noktadan hareketle, EGCG'nin etkileri çalışmamızda normal (5,5 mM) ve yüksek glukoz konsantrasyonu (25,5 mM) altında incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Bu amaçla, taze izole edilen ventriküler kardiyomyositler 3 saat süreyle yüksek glukoz varlığında inkübe edilmiştir. EGCG ise bir grup hücreye glukoz uygulamasından 30 dakika önce ilave edilmiştir. Ion-Optix kenar deteksiyon sistemi ile hücre kısalma-uzaması sırasında hücre boyutundaki değişiklikler kaydedilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: EGCG yüksek konsantrasyonda glukoz inkübasyonu sonucu gelişen hipertrofik yanıtı düzeltmektedir. Ancak, EGCG hem normal hem de yüksek glukoz konsantrasyonu varlığında kontraktilitenin azalmasına neden olmaktadır. Bu negatif inotropik etkisinin detaylı mekanizmasının anlaşılabilmesi için ek çalışmalara gerek duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: kardiyomyosit, hiperglisemi, hipertrofi, EGCG

* **Corresponding Author / Sorumlu Yazar:** Gizem Kaykı Mutlu
e-mail: gkayki@ankara.edu.tr, phone: +903122033141, fax: +903122131081

ABSTRACT

Objective: Cardiovascular complications are the leading causes of mortality and morbidity in diabetic patients. Hyperglycemia plays the major role in the pathogenesis of these complications. On the other hand, dietary polyphenols are known to have preventive effects on the development of cardiac diseases. Tea consumption, which is known to be a rich source of polyphenols, has been shown to decrease incidence of cardiac diseases and cardiovascular mortality. Epigallocatechin gallate (EGCG) is the major polyphenolic substance found in tea. EGCG is known to have protective effects in cardiac pathologies such as diabetes. Nevertheless, to our knowledge, their direct cardiac effect at the cellular level is not known. Thus, we aimed to investigate its effects under normal (5,5 mM) and high glucose (25,5 mM) concentrations.

Material and Method: With this purpose, freshly isolated ventricular cardiomyocytes were incubated with high glucose for 3 hours. EGCG was added 30 min prior to high glucose to a group of cells. A video-based edge detection system (IonOptix) was used to record changes in cell length during cell shortening and relengthening.

Result and Discussion: EGCG decreased hypertrophic response of hyperglycemia. However, it decreases contractility under both normal and high glucose concentrations. To understand the detailed mechanism of its negative inotropic effect, further investigation is needed.

Keywords: cardiomyocytes, hyperglycemia, hypertrophy, EGCG

GİRİŞ

Diabetes mellitus, kronik hiperglisemi sonucu birçok organda hasara yol açan ve bunun sonucunda çok sayıda komplikasyona neden olan bir sendromdur. Kardiyak komplikasyonlar diyabetik morbidite ve mortalitenin en önemli nedenidir. Prevalansı gün geçtikçe artan kardiyak komplikasyonlar diyabetik hastaların %40-60'ında görülmektedir [1].

Bitkisel kaynaklı gıda tüketiminin kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi birçok kronik hastalık insidansında azalmayla ilişkili olduğunu gösteren epidemiyolojik çalışmalar bulunmaktadır [2-4]. Son 10 yıldır bu koruyucu etkinliğin geniş bir fitokimyasal ailesine ait ve günlük diyetle en sık tüketilen, antioksidan özelliğe sahip polifenoller sayesinde gerçekleştiği üzerinde durulmaktadır [5]. Birçok çalışma polifenollerin oksidasyona karşı hücre yapı taşlarını koruyucu etkilerinin önemini belirtmektedir [6]. Polifenollerce zengin gıda tüketiminin kardiyovasküler hastalık riskini azalttığı bilinmektedir [7]. Polifenollerin ayrıca antioksidan etkileri ile diyabet riskini azaltabileceği öne sürülmektedir [8,9]. Polifenol içeren bazı fitoterapötiklerin kan glukoz düzeylerinin kontrolü, glukoz kullanımı ve insulin sekresyonunda pozitif rolleri olduğundan söz edilmektedir [10].

Polifenol bakımından çok zengin bir bitki olan çay, kalp hastalığı riski ve kardiyovasküler mortaliteyi azaltmaktadır [11]. Çayın içerdiği başlıca flavonoid epigallocatekin gallat (EGCG)'tır. EGCG'nin, hipertrofi, iskemik remodelling ve sol ventrikül yetmezliğine karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, endotelial nitrik oksid sentaz aktivasyonu üzerinden endotel bağımlı gevşemeye aracılık etmektedir. EGCG, Na/H değiş tokuşcusu ve ters modda çalışan Na⁺/Ca²⁺ değiş tokuşcusu üzerinden pozitif inotropik ve lusitropik etki göstermektedirler [11]. Öte yandan, yüksek dozlarda EGCG'nin beta 2-ARler aracılı olarak aritmi ve diyastolik disfonksiyona yol açtığı gösterilmiştir [12].

Ne var ki, bu bileşiğin hiperglisemi durumunda kalpte hücre düzeyindeki direkt etkileriyle ilgili literatür bilgisi yetersizdir. Çalışmamız bu eksikliği gidermeyi planlamaktadır. Bu amaçla, ECGC'nin normoglisemik ve hiperglisemik ortamda izole sıçan kardiyomyositlerinin mekanik fonksiyonları üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kardiyomiyosit İzolasyonu:

Çalışmamızda 300-400 g ağırlığında, 8-10 haftalık Sprague Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar Bilkent Üniversitesinden temin edilmiş ve deney gününe kadar Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deneysel Hayvanları Biriminde bakımları yapılmıştır. Bu çalışma için Ankara Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurulundan gerekli izin alınmıştır (etik kurul onay no: 2017-5-34). Deneysel günü sıçanların göğüs kafesleri açılarak kalpleri alınmış ve heparinli soğuk Tyrode çözeltisi içeren kaplara konmuştur. Hemen ardından kalpler aortalarından Langendorff sistemine asılmıştır. Öncelikle kalpler (mmol/L) NaCl 117, KCl 5.7, NaHCO₃ 4.4, KH₂PO₄ 1.5, MgCl₂ 3.6, HEPES 20, glukoz 11.7 ve taurin 20 (pH=7.2) içeren Ca⁺⁺ içermeyen Tyrode solüsyonu ile perfüze edilmiştir. Kandan tamamen temizlenen ve atımı duran kalpler daha sonra 30 ml'sinde 0.036 g kollajenaz içeren Tyrode ile perfüze edilmiştir. 30 dakikalık enzimatik perfüzyon bittikten sonra kalpler Ca⁺⁺ içermeyen Tyrode solüsyonuna (pH=7.4) alınmış ve mekanik olarak parçalanmıştır. Elde edilen süspansiyon 200 µm aralıklı naylon filtreden süzülmüş ve hücreler 37°C'de bekletilmiştir. Elde edilen hücre pelletinin üzerindeki supernatant atılmıştır. Daha sonra Ca⁺⁺ adaptasyonu için hücre pelletinin üzerine önce 0.3 mM, daha sonra da 0.5 mM Ca⁺⁺ içeren Tyrode çözeltisi eklenmiştir.

Hiperglisemik modelin oluşturulması ve hücrelerin inkübasyonu:

Ca⁺⁺ adaptasyonu tamamlanan hücreler kültür ortamına alınmıştır. Bu amaçla 2 mM carnitine, 5 mM creatine, 5 mM taurine ve 100 U/ml penisilin-100 µl/ml streptomisin içeren M199 medium hazırlanmıştır. 5.5 mM glukoz içeren bu medium ile inkübe edilen hücreler normoglisemik (NG) olarak kabul edilmiştir. Yüksek glukoz konsantrasyonları uygulanacak hücreler için ise kültür ortamına toplamda 25.5 mM glukoz içerecek şekilde dışardan 20 mM glukoz eklenmiştir. Yüksek glukoz konsantrasyonu varlığında inkübe edilen hücreler ise hiperglisemik (HG) olarak kabul edilmiştir. Kültür ortamına alınan kardiyomyositler 3 saat süreyle 37° C'de %5'lik CO₂ inkübatöründe bekletilmiştir.

Çalışmada kullanılacak ECGC toz halde temin edilmiş DMSO'da çözülerek hazır hale getirilmiştir. Deneysel kullanılabilecek ECGC konsantrasyonuna (20 µM) literatür taraması yapılarak karar verilmiştir [13]. ECGC, hücre ortamına hiperglisemi uygulamasından yarım saat önce eklenmiştir.

Yarım saat sonunda bu hücreler yüksek glukoz içeren mediuma alınmıştır. 3 saat sonunda tüm hücreler ölçümler için hazır hale gelmiştir.

Kardiyomyositlerde Kontraktilite Ölçümü:

Kardiyomyositlerin mekanik özellikleri, *SoftEdge Myocam (IonOptix®)* sistemi ile incelenmiştir. Kardiyomyositlere 0.5-1-2 Hz frekanslar uygulanmıştır. Hücre ve sarkomer boyutlarında oluşan uzama- kısıalma boyutları kaydedilmiştir. Elde edilen yanıtlar analiz edilerek dinlenimdeki hücre uzunluğu, maksimum kısıalma boyutu, kısıalma-uzama hızları ($\pm dL/dt$) ve uzamanın % 90'ına inmesi için gerekli süre (TR_{90}) parametreleri hesaplanmıştır.

İstatistiksel analiz:

Deney sonuçları ortalama \pm S.E.M olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık ANOVA ile test edilmiş ve gruplar arası çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni post hoc test kullanılmıştır. İstatistiksel analiz için Graphpad Prism programı kullanılmıştır. $P<0.05$ istatistiksel anlamlılık eşiği olarak kabul edilmiştir.

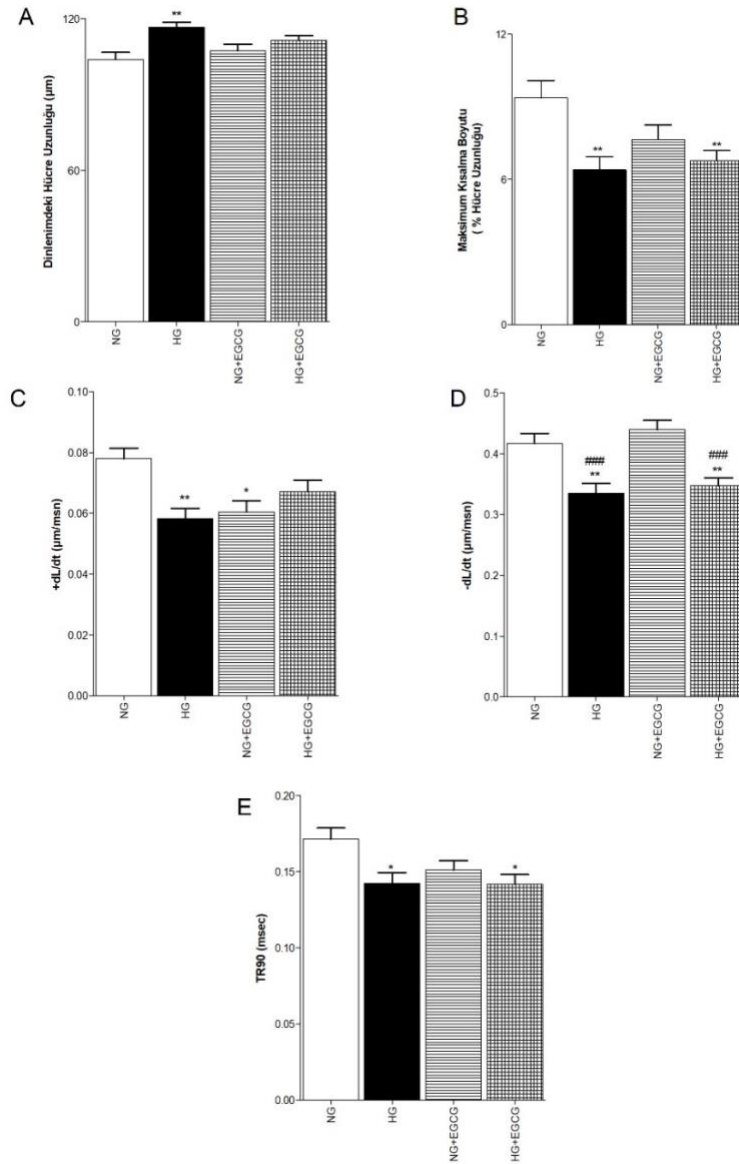
SONUÇ VE TARTIŞMA

Dinlenim durumundaki hücre uzunlukları incelendiğinde hiperglisemik ortamda inkübe edilen hücrelerin boyutlarında artış gözlenmiştir. Bu artış hipertrofik bir sürecin başlangıcına işaret etmektedir. Epigallokateşin gallat ile inkübe edilen hücrelerde ise bu artışın kısmen az olduğu, hipertrofik yanıtın azaldığı görülmüştür (Şekil 1A).

Daha sonra, hücrelere 0.5 Hz frekansta elektriksel uyarı uygulanmıştır. Hiperglisemik hücrelerin kasılma boyutu önemli derecede azalmıştır. Hücrelerin ayrıca, birim zamanda kısıalma ve uzama hızları karşılaştırılmıştır. Hiperglisemik hücrelerde kısıalma-uzama hızının da anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (Şekil 1C ve D). Bu durum “diyabet-benzeri” bir tablo geliştiğini göstermektedir. Öte yandan, normoglisemik hücrelere uygulanan EGCG hücre kasılma boyutunu anlamlı olmamakla birlikte azaltmıştır (Şekil 1B). Buna ek olarak, kasılabilirliği değerlendirmek için kullanılan bir diğer parametre olan kısıalma hızı da ($+dL/dT$) EGCG varlığında normoglisemik hücrelerde azalmaktadır. Hiperglisemik hücrelerde de bu etki daha az bir oranda olmasına karşın devam etmektedir (Şekil 1C). İlginç olarak, EGCG inkübasyonunun hem normoglisemik hem de hiperglisemik hücrelerde, gevşeyebilirliğin değerlendirilmesi için kullanılan uzama hızı ($-dL/dT$) üzerinde etkisiz olduğu gözlenmiştir (Şekil 1D). Öte yandan, kısıalma ve uzama performanslarının bir başka göstergesi olarak kardiyomyositlerin uzamanın % 90'ına inmesi için gerekli süre olan TR_{90} parametresi de karşılaştırılmıştır. TR_{90} da EGCG varlığında hem normoglisemik hem de hiperglisemik hücrelerde azalmaktadır (Şekil 1E).

Çalışmamızın temel amacı, kardiyoprotektif etkileri olduğu bildirilen EGCG'nin hiperglisemik koşullarda direkt olarak kardiyomyositlerin mekanik aktivitesi üzerine bir etkisinin olup olmadığının

araştırılmasıdır. Ne var ki, EGCG hücre boyutlarını azaltarak anti-hipertrofik bir etkinlik göstermesine karşın kardiyak kasılabilirlik üzerine direkt olarak koruyucu bir etkinlik göstermemektedir. Hem normoglisemik hem de hiperglisemik hücrelerde EGCG'nin kontraktiletiyi azalttığı, bir diğer deyişle negatif inotropiye neden olduğu gözlenmiştir. Öte yandan, gevşeyebilirlik (lusitropi) üzerine ise bir etkisi bulunmamaktadır. EGCG'nin gözlenen bu negatif inotropik etkisinin kalpteki beta adrenoseptör alttıpleri ya da iyon kanalları gibi çeşitli hedefler üzerinden direkt olarak mı ya da daha önceki çalışmalarla gösterilen antioksidan etkinliğinin bir sonucu olarak indirekt olarak mı gerçekleştiğinin anlaşılabilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 1. Hücrelerin dinlenme uzunluğu (A), elektriksel olarak uyarılan hücrelerin maksimum kısalma boyutu (B), kısalma hızı (C), uzama hızı (D) ve uzamanın % 90'ına inmesi için gerekli süreye (TR₉₀) (E) ait bar grafikleri. NG, normoglisemik (5.5 mmol/L); HG, hiperglisemik (HG - 25.5 mmol/L); NG+EGCG, EGCG ile inkübe edilen normoglisemik; HG+EGCG, EGCG ile inkübe edilen hiperglisemik hücreler. *, p<0.05, NG'ye göre anlamlılık; **, p<0.01, NG'ye göre anlamlılık; ###, p<0.001, NG+EGCG'ye göre anlamlılık.

TEŞEKKÜR

Çalışmamız Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Tarafından desteklenmektedir (17B0237003).

KAYNAKLAR

1. Bell, D.S. (2003). Diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care*, 26(10),2949-51.
2. Bacanlı, M., Taner, G., Basaran, A.A., Basaran, N. (2015). Bitkisel Kaynaklı Fenolik Yapıdaki Bileşikler ve Sağlığa Yararlı Etkileri Türkiye Klinikleri. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4 (1), 9-16.
3. Dauchet, L., Amouyel, P., Dallongeville, J. (2005). Fruit and vegetable consumption and risk of stroke: a meta-analysis of cohort studies. *Neurology* ,65, 1193–1197.
4. Hu, F.B., Willett, W.C. (2002). Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA*, 288, 2569–2578.
5. Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl.), 215S–217S.
6. Collins, A.R. (2005) Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl.): 261S-267S.
7. Yamagata, K., Tagami, M., Yamori, Y. (2015). Dietary polyphenols regulate endothelial function and prevent cardiovascular disease. *Nutrition*, 31(1), 28-37.
8. Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Azizi, F. (2013). Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: A review. *Journal Diabetes Metabolic Disorders*, 12, 43.
9. Bacanlı, M., Goktas, H.G., Basaran, A.N., Arı, N., Basaran, A.A. (2016). Beneficial Effects of Commonly Used Phytochemicals in Diabetes Mellitus. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 54(1), 9-20
10. Hajiaghaalipour, F., Khalilpourfarshbafi, M., Arya, A. (2015). Modulation of glucose transporter protein by dietary flavonoids in type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Biological Sciences*, 11, 508–24.
11. Lorenz, M., Hellige, N., Rieder, P., Kinkel, H.T., Trimpert, C., Staudt, A., Felix, S.B., Baumann, G., Stangl, K., Stangl, V. (2008). Positive inotropic effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) involve activation of Na⁺/H⁺ and Na⁺/Ca²⁺ exchangers. *European Journal of Heart Failure*, 10(5), 439-45.
12. Bao, L., Lu, F., Chen, H., Min, Q., Chen, X., Song, Y., Zhao, B., Bu, H., Sun, H. (2015). High concentration of epigallocatechin-3-gallate increased the incidences of arrhythmia and diastolic dysfunction via β 2-adrenoceptor. *Journal of Food Science*, 80(3), T659-63.

13. Wu, Y., Xia, Z.Y., Zhao, B., Leng, Y., Dou, J., Meng, Q.T., Lei, S.Q., Chen, Z.Z., Zhu, J. (2017). (-)-Epigallocatechin-3-gallate attenuates myocardial injury induced by ischemia/reperfusion in diabetic rats and in H9c2 cells under hyperglycemic conditions. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(2), 389-399.